

Утверждена 26 мая 1998г.

## **ВРЕМЕННАЯ ИНСТРУКЦИЯ по борьбе с вibriозом рыб**

1. Вibriоз - инфекционное заболевание, чаще поражающее рыб и других гидробионтов, обитающих в соленых, солоноватых и реже - в пресных водах.

Заболевание вibriозом регистрируют у лососевых рыб, угря, щуки, плотвы, окуня, камбалы, трески, сельдевых и рыб других видов.

Болезнь чаще всего протекает в острой септической форме, а при эпизоотиях и после лечения антибиотиками - в хронической форме.

Возбудитель болезни - бактерии *vibrio anguillarum*, входят в род *vibrio*, семейство *vibrionaceae*.

2. Диагноз на вibriоз устанавливают:

- по результатам изучения культуральных, морфологических и ферментативных свойств возбудителя, выделенного при бактериологическом исследовании патологического материала от рыб, при наличии у рыб клинических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для данной болезни, а в случае бессимптомного течения болезни при гибели рыб;
- при получении положительного результата биопробы с использованием возбудителя болезни, выделенного из патологического материала от рыб и наличии у рыб клинических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для данной болезни, а в случае бессимптомного течения болезни при гибели рыб;
- при положительном результате серологического типирования возбудителя, выделенного из патологического материала от рыб, при наличии у рыб клинических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для данной болезни, а в случае бессимптомного течения болезни при гибели рыб;
- при положительном результате исследования сыворотки крови рыб в РА с антигеном эритроцитарным вibriозным и наличии у рыб клинических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для данной болезни, а в случае бессимптомного течения болезни при гибели рыб.

В каждом случае при постановке диагноза учитывают эпизоотологические данные.

3. При подозрении на вibriоз рыб ветеринарный врач, обслуживающий рыбоводный завод или рыбоводное хозяйство, совместно с представителем завода (хозяйства) выясняет:

- время зарыбления водоемов и рыбоводно-биологические показатели;
- показатели температуры воды в водоемах и содержание в ней кислорода в течение недели перед заболеванием;
- время появления первых случаев заболевания;
- динамику отхода рыб в каждом садке (бассейне);
- состав и качество кормов, и режим кормления;
- плотность посадки рыб и возможность загрязнения воды.

О возникшем заболевании ветеринарный врач сообщает руководителю завода (хозяйства), главному ветеринарному врачу района, направляет материал для лабораторного исследования и организует мероприятия по ликвидации и недопущению распространения болезни.

4. При подтверждении диагноза рыбоводный завод (рыбоводное хозяйство) в установленном порядке объявляют неблагополучным по вibriозу рыб. Главный ветеринарный врач района берет такой завод (хозяйство) на учет и совместно с руководителем и специалистами завода (хозяйства) разрабатывает план оздоровительных, ветеринарно-санитарных и организационно-хозяйственных мероприятий в соответствии с действующими Ветеринарно-Санитарными правилами для рыбоводных хозяйств и Ветеринарно-Санитарными правилами для лососевых рыбоводных заводов.

5. В неблагополучных по вibriозу заводах (хозяйствах) вводят ограничения, при которых запрещается:

- ввоз и вывоз икры и живой рыбы для целей разведения и выращивания;
- вывоз кормов, изготовленных из больных рыб, и использование их на корм рыбам без термической

обработки;

- пересаживание рыб из неблагополучных по вибриозу садков (бассейнов) в благополучные и наоборот;  
- использование орудий лова, оборудования, инвентаря из неблагополучных садков (бассейнов) для работы в благополучных.

6. В водоемах (емкостях), где установлено заболевание, прекращают кормление рыб до начала лечения, затем назначают качественные витаминизированные, а также лечебные корма в количестве 50-70 процентов от нормы.

7. В водоемах (емкостях), где установлено заболевание, повышают аэрацию за счет увеличения подачи холодной пресной воды из глубоких мест водозабора или артезианских скважин, при возможности садки отбуксировывают или притапливают в зоны с более низкой температурой воды

8. Ветеринарный врач, обслуживающий завод (хозяйство), проводит ежедневный клинический осмотр рыб в водоемах и организует сбор погибшей рыбы с последующим ее обеззараживанием и утилизацией

9. Ограничения с рыбоводного завода (рыбоводного хозяйства) снимают и объявляют его благополучным по вибриозу рыб по истечении одного года, а с естественного водоема - по истечении двух лет после полного прекращения заболевания (отсутствие у рыб клинических признаков болезни, отрицательные результаты бактериологических исследований рыб) и только после проведения комплекса оздоровительных ветеринарно-санитарных и организационно-хозяйственных мероприятий.

10. Для лечения рыб применяют фуразолидон, окситетрациклин, тетрациклин, левомицетин.

10.1. Выбор препарата, его дозировку и продолжительность лечения определяют в зависимости от чувствительности возбудителя к препарату, формы течения заболевания, возраста и состояния рыбы, температуры воды и других факторов.

10.2. Фуразолидон при остром течении вибриоза применяют для лечения всех возрастных групп в течение 10 дней из расчета 9 г на 100 кг массы первый день и по 8 г в последующие дни лечения.

10.3. При хроническом течении вибриоза фуразолидон применяют в течение 10 дней из расчета 10 г на 100 кг массы рыбы в день. При необходимости после окончания первого курса лечения проводят второй.

10.4. При температуре воды выше 17°C, а также при появлении первых признаков болезни, рыбам назначают фуразолидон в течение 10 дней в дозе 7-8 г на 100 кг массы рыбы в день.

10.5. Оксететрациклин дают из расчета 7 г на 100 кг массы рыбы в течение 10 дней.

10.6. Левомицетин применяют из расчета 5 г на 100 кг массы рыбы в первый день и по 3 г в течение 2-6 последующих дней лечения.

10.7. Товарную рыбу, получавшую препараты, нельзя направлять в реализацию ранее, чем через 30 дней после окончания лечения.

11. В целях профилактики вибриоза рыб посадочный материал следует отбирать из хозяйств, благополучных по данной болезни. Рыбы не должны иметь травматических повреждений и признаков других болезней.

12. Из пресной воды в морскую и солоноватую переводят рыб не моложе двухлетнего возраста, массой не менее 100 г. Перемещают их постепенно: каждому изменению солёности на 5% должен предшествовать период в 4-5 дней.

13. При перевозках и пересадках рыбы нельзя допускать резких колебаний температуры воды (предельная разница 2 -2,5°C). Температура воды в акваториях, куда помещают садки с посадочным материалом, должна быть не выше 20°C.

14. В период выращивания рыб необходимо следить за качеством кормов и режимом кормления, не допускать воздействия на рыб стрессовых факторов.

15. Для создания резистентного к вибриозу маточного стада следует отбирать особей не болевших в период вибриозной эпизоотии и имеющих нормальные физиологические показатели.

16. В хозяйствах необходимо осуществлять мероприятия, предусмотренные действующими ветеринарно-санитарными правилами для рыбоводных хозяйств.

17. В общий комплекс мероприятий против вибриоза рыб должна быть включена специфическая профилактика болезни с применением вакцин, принятых в ветеринарную практику.

*Временная инструкция по профилактике и ликвидации с вибриоза рыб разработана взамен Методических указаний по лабораторной диагностике вибриоза рыб, утвержденных ГУВ МСХ СССР 30.03.1983 г. и Временной инструкции о мероприятиях по борьбе с вибриозом радужной форели, утвержденной ГУВ МСХ СССР 30.03.1983 г.*

---

*Приложение № 1 к Временной инструкции по борьбе с вибриозом рыб от 26 мая 1998г. Вибриоз рыб (справка)*

1. Возбудитель вибриоза рыб - бактерии *vibrio anguillarum* представляют собой короткие, тонкие (1,6-2,5 x 0,4-1,0 мкм), слабоизогнутые грамотрицательные палочки не образующие спор и капсул. Активную подвижность бактерий обеспечивает один полярно расположенный жгутик. Бактерии являются факультативными анаэробами. Они продуцируют протеолитические ферменты и токсины.

Бактерии *vibrio anguillarum* выделяют из воды, ила и от гидробионтов. Возбудитель болезни попадает в организм рыбы через жабры, оральным и анальным путями.

2. При подозрении на вибриоз обращают внимание на частоту и время вспышек болезни со сходной клинической картиной, температуру воды и её соленость, динамику заболевания и отход рыбы:

а) рыбы заболевают вибриозом преимущественно в летние месяцы при нагревании воды до температуры выше 16°C. Заболевание достигает максимума при температуре 19-20°C.

б) максимальный отход рыбы регистрируется при солености воды 6,5-8,5‰.

в) наибольшие потери (гибель) регистрируют среди годовиков и сеголетков в первый месяц с момента заболевания, особенно при высокой плотности посадки.

3. Из клинических признаков при остром течении болезни у рыб в первую очередь регистрируют отказ от корма и снижение двигательной активности. У части рыб наблюдается орошение чешуи, покраснение кожных покровов у основания плавников, анального отверстия и в других частях брюшной стенки, а также геморагии, некротические изменения и изъязвления в коже и мышцах. У части рыб болезнь протекает бессимптомно, но со значительным отходом, особенно среди годовиков и двухлетков. При бактериологическом исследовании возбудитель болезни легко высевается из крови.

При хроническом течении болезни (свыше 7-8 недель) характерным признаком является наличие в мышцах рыб абсцессов и длительно незаживающих язв. Возбудитель болезни редко высевается из крови, но высевается из внутренних органов.

4. Патологоанатомические изменения характеризуются выраженной гиперемией и геморагиями тканей внутренних органов при увеличении их размеров, наличием интрамуральных абсцессов, некрозов и язв, а в брюшной полости - асцитной жидкости. Желудок и кишечник пустые, гиперемированные. Анус выпяченный и отечный. Кожа на разрезе в месте припухлостей темно-красного цвета, мышечная ткань дряблая.

5. При бактериологическом исследовании на вибриоз патологический материал отбирают только от живых рыб:

5.1. Для исследования берут пробы крови из сердца и содержимого брюшной полости, материал из полости абсцессов и стенок язв, сердце, печень, селезенку и почки.

5.2. Место отбора материала прижигают шпателем, после чего стерильной пастеровской пипеткой отбирают пробу материала и переносят ее в одну пробирку с 6 см<sup>3</sup> мясо-пептонного бульона (МПБ - см. приложение № 2, п.1.1.) или пептонной воды, содержащих 1,5% хлорида натрия. После 2-3

пипеттированный посевной материал в объеме 0,5-1,0 см<sup>3</sup> засевают в две пробирки на скошенный мясо-пептонный агар (МПА - см. приложение № 2, п.1.2.) с 1,5% хлористого натрия и в две пробирки на скошенный дифференциально-диагностический агар (ДДА - см. приложение № 2, п. 1.3.). Посевы инкубируют при температуре 20-22°C. Учет проводят каждый день в течение 7 суток. Полученные культуры подвергают бактериоскопии. Затем определяют их подвижность и галофильность, оценивают рост колоний при посеве на обычные и дифференциальные среды и ставят с ними биопробу.

**5.3. Бактериоскопия.** На чистое обезжиренное стекло наносят стандартной бактериологической петлей (диаметр 2 мм) каплю физиологического раствора, тщательно суспендируют в ней небольшое количество исследуемой культуры и равномерно распределяют суспензию по поверхности стекла. Препарат высушивают при комнатной температуре и фиксируют путем проведения 5-6 раз над пламенем горелки. После охлаждения препарат окрашивают по Граму. Вначале - в течение 2 мин карболовым раствором генцианового фиолетового. Смыть краску водой, препарат помещают на 2 мин в раствор Люголя. Затем в течение 30 секунд обрабатывают 96%-ным спиртом. Тщательно отмыв препарат от спирта, окрашивают его в течение 2 мин фуксином Пфейфера.

После промывания водой и просушивания фильтровальной бумагой препарат микроскопируют при увеличении 10x90 под иммерсией. Бактерии, окрасившиеся в синий, цвет считают грамположительными; и красный цвет - грамотрицательными. Вибрионы грамотрицательны.

**5.4. Определение подвижности.** На обезжиренное предметное стекло наносят бактериологической петлей каплю физиологического раствора, суспендируют в ней небольшое количество испытуемой культуры и накрывают покровным стеклом. Препарат микроскопируют при увеличении 10x90. Бактерии *vibrio anguillarum* активно подвижны.

**5.5. Определение галофильности.** Исследуемую культуру высевают на МПА без содержания хлористого натрия и на МПА с 1,5-, 3-, 7-, 10% хлористого натрия, скошенный и пробирках. Посевы инкубируют при 20-22°C в течение 48 часов. Оценка результатов теста проводят, исходя из того, что культуры *vibrio anguillarum*, кроме типа С, не растут на среде без содержания хлористого натрия, а также, что все они не растут при содержании в среде 7,0% и более хлористого натрия, но хорошо растут при концентрации соли от 0,25 до 5,2%.

**5.6. Оценка роста вибрионов на плотных питательных средах.** Испытуемые культуры бактерий, сходные по культуральным свойствам и морфологии с вибрионами, суспендируют в стерильном физиологическом растворе с таким расчетом, чтобы концентрация микробных клеток составила 1 млрд/см<sup>3</sup> по оптическому стандарту мутности ГИСК. Приготовленные суспензии разводят последовательно десятикратно до 10<sup>-6</sup> и из последних разведений в объеме 0,1см<sup>3</sup> высевают на МПА с 1,5% хлористого натрия и ДДА, разлитые в чашки Петри. Посевы инкубируют при температуре 20-22°C в течение 48 часов.

На МПА вибрионы растут в виде прозрачных, светлых выпуклых колоний с ровными краями, имеющих в проходящем свете светло-голубоватый оттенок.

По оценке роста колоний на ДДА проводят ориентировочную дифференциацию вибрионов от других микроорганизмов. На данной среде вибрионы формируют колонии желтого цвета, без изменения цвета среды вокруг колоний. Также в виде колоний желтого цвета на ДДА растут некоторые штаммы аэромонад и псевдомонад, но среда вокруг колоний становится синеватой. Колонии *v. parachemolyticus* на этой среде имеют голубоватый цвет.

Типичные для *vibrio anguillarum* колонии отбирают бактериологической петлей и пересевают на МПА с 1,5% хлористого натрия, скошенный в пробирках. Посевы инкубируют при температуре 20-22°C и течение 24-48 часов. Выращенные культуры используют для постановки биопробы и изучения ферментативных свойств бактерий.

**5.7. Биопроба.** Для определения патогенности односуточную культуру вибрионов суспендируют в физиологическом растворе и вводят 3-5 рыбам аналогичного вида массой 100-200 г внутримышечно и 3-5 рыбам -внутрибрюшинно в дозе 200 млн микробных клеток в объеме 0,2 см<sup>3</sup>.

Из пяти рыб аналогов формируют контрольную (без введения культуры) группу и выдерживают ее и отдельном аквариуме. Температура воды в аквариумах должна быть 18-20°C. Срок наблюдения 18 суток.

В случае заболевания или гибели инфицированной рыбы проводят бактериологическое исследование взятого от неё патологического материала, с последующей идентификацией выделенной культуры по результатам серологического исследования с агглютинирующей сывороткой против *vibrio anguillarum*, или - результатам изучения ферментативных свойств.

Биологическая проба считается положительной, а диагноз на вибриоз установленным при проявлении не менее чем у 50% рыбы, инфицированной испытуемой культурой, клинических признаков болезни или при ее гибели и выделении от такой рыбы культуры *vibrio anguillarum*. Рыбы контрольной группы, при этом, должны оставаться живыми.

#### 6. Изучение ферментативных свойств:

6.1. Определение продукции цитохромоксидазы. а-нафтол в количестве 30-40 мг растворяют в 2,5 см<sup>3</sup> 96%-ного этилового спирта (ректификованного), затем прибавляют 7,5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 60 см<sup>3</sup> диметил-парафенилендиамина. Реактив готовят *ex tempore* и обрабатывают им полоски фильтровальной бумаги размером 1,5 x 9 см. Исследуемую культуру наносят штрихом с помощью бактериологической петли на обработанную реактивом полоску бумаги. Если на полоске бумаги в месте нанесения культуры появляется синее окрашивание, культуру оценивают как оксидазоположительную. Если цвет не изменяется - как оксидазоотрицательную. Бактерии *vibrio anguillarum* оксидазоположительные.

6.2. Определение продукции сероводорода. Полоску фильтровальной бумаги (1x10 см), обработанную насыщенным водным раствором уксуснокислого свинца и высушенную в термостате, помещают в пробирку со скошенным МПА с 1,5% *насі* непосредственно после засева испытуемой культуры таким образом, чтобы нижний край полоски находился на расстоянии 1 см от питательной среды. Посевы инкубируют при температуре 20-22°C в течение 5 суток. Результаты учитывают ежедневно. Почернение нижней части полоски фильтровальной бумаги оценивают как положительный результат. Бактерии *vibrio anguillarum* сероводород не продуцируют.

6.3. Тест окисления ферментации на среде Хью-Лейфсона. Среду, состоящую из 3,0 г агара; 2,0 г пептона; 15,0 г хлорида натрия; 0,3 г двузамещенного фосфатнокислого калия; 3 см<sup>3</sup> 1% водного раствора бромтимолблау; 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды стерилизуют при 121°C (1 атм) в течение 15 мин. После охлаждения до 45-50°C в среду вносят 25 см<sup>3</sup> 40%-ного раствора глюкозы и разливают по 3 см<sup>3</sup> в пробирки. Исследуемую культуру засевают уколом в две пробирки со средой. Стерильной пипеткой на поверхность среды одной из пробирок наносят 1 см<sup>3</sup> стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при 22-25°C в течение 4 суток. Видовую принадлежность культуры оценивают, исходя из того, что вибрионы и аэромонады ферментируют глюкозу как в аэробных условиях - пожелтение среды в пробирках без вазелина (0+), так и в анаэробных - пожелтение среды в пробирках под вазелином (f+). При прочих результатах теста культуру считают не принадлежащей к роду *vibrio* и *aeromonas*.

6.4. Протеолитические свойства. Исследуемую культуру засевают уколом в столбики желатина в 2 пробирки. Посевы инкубируют при температуре 20-22°C в течение 4 суток. Перед учетом результатов пробирки с посевами вместе с контролем (без посева) помещают на 20 мин в холодильник. Если желатин остается твердым, как в контроле, то результат оценивают как отрицательный. При положительном результате желатин разжижается и остается жидким при выдерживании в холодильнике. Бактерии *vibrio anguillarum* разжижают желатин.

6.5. Проба на индол. Индол образуется в результате распада аминокислот под действием микроорганизмов. Испытуемую культуру выращивают на бульоне Хоттингера при температуре 20-22°C в течении 4 суток. В пробирку, содержащую 5 см<sup>3</sup> бульонной культуры, вносят 6 капель реактива Ковача, который готовят следующим образом: в 150 см<sup>3</sup> растворяют 10,0 г парадиметиламинобензоальдегида, после чего к раствору медленно добавляют 50 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты. При окрашивании содержимого пробирки в розовый цвет результат пробы оценивают положительно. Если окрашивание не наступило - отрицательно. Бактерии *vibrio anguillarum* - за исключением биотипов "В" и "С", - считаются индоположительными.

6.6. Декарбоксилазная активность. Декарбоксилазную активность определяют на жидких питательных средах с аминокислотами (лизином, орнитинем, аргинином), приготовленными по Меллеру (см. приложение № 2. п.1.4.).

Каждый исследуемый штамм засевают в 4 пробирки - соответственно с лизином, орнитином, аргинином и без добавления аминокислоты (контроль). В каждую пробирку засевают по одной полной бактериологической петле культуры. Сразу после засева во все пробирки добавляют стерильное вазелиновое масло. Посевы инкубируют при температуре 20-22°C в течение 6 суток. Изменение цвета среды указывает на декарбоксилазную активность изучаемой культуры.

Бактерии *vibrio anguillarum* не декарбоксилируют орнитин и лизин, но проявляют аргининдегидролазную активность.

6.7. Уреазную активность бактерий *vibrio anguillarum* определяют на средах с мочевиной. Испытуемую культуру засевают петлей на агар Кристенсена (см. приложение № 2, п.1.5.) и инкубируют при температуре 20-22°C в течение 2-4 суток. Расщепление мочевины определяют по изменению цвета среды от желтого к фиолетово-красному. Бактерии *vibrio anguillarum* не обладают уреазной активностью и, таким образом, не разлагают мочевину.

6.8. Ферментация углеводов и многоатомных спиртов. В качестве основы для приготовления сред с углеводами используют 1%-ную пептонную воду (рН 7,2-7,4) с 1,5% хлористого натрия. В воду добавляют (отдельно) по 1% мальтозы, лактозы, глюкозы, сахарозы, маннозы, арабинозы, маннита, инозита и в каждую пробирку по 1% индикатора Андраде. Среды в объеме по 2 см разливают в пробирки с поплавками и стерилизуют при температуре 110-112°C (0,5 атм) в течение 20 мин. Результаты роста культур на средах с углеводами учитывают на 4-е сутки после культивирования при температуре 20-22°C. Об образовании кислоты, при расщеплении углеводов и спиртов судят по покраснению (бесцветных) сред, а о газообразовании по наличию в поплавках пузырьков газа. Бактерии *vibrio anguillarum* расщепляют углеводы, за исключением инозита, до кислоты без образования газа.

Результаты изучения культуральных, морфологических и ферментативных свойств используют для дифференциации бактерий *vibrio anguillarum* от других бактерий, вызывающих у рыб заболевания с сходными клиническими признаками (таблица 1). Таблица 1 Дифференциально-диагностические свойства бактерии *vibrio anguillarum* и бактерии, вызывающих у рыб сходные заболевания

| Основные признаки            | <i>vibrio anguillarum</i> | <i>aeromonas</i> | <i>pseudomonas</i> | <i>plesiomonas</i> | <i>enterobacteriaceae</i> | <i>v.parahaemolyticus</i> | <i>aeromonas salmonicida</i> |
|------------------------------|---------------------------|------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 1                            | 2                         | 3                | 4                  | 5                  | 6                         | 7                         | 8                            |
| Подвижность                  | +                         | +                | +                  | +                  | ±                         | -                         | +                            |
| Оксидаза                     | +                         | +                | +                  | +                  | -                         | +                         | +                            |
| Образование h <sub>2</sub> s | -                         | +                | ±                  | -                  | ±                         | -                         | +                            |
| Расщепление глюкозы:         |                           |                  |                    |                    |                           |                           |                              |
| - окисление                  | +                         | +                | +                  | -                  | +                         | +                         | +                            |
| - ферментация                | +                         | -                | -                  | ±                  | ±                         | +                         | -                            |
| Ферментация:                 |                           |                  |                    |                    |                           |                           |                              |
| - сахарозы                   | + <sub>к</sub>            | ±                | -                  | -                  | ±                         | -                         | ±                            |
| - маннозы                    | + <sub>к</sub>            | +                | -                  | ±                  | ±                         | +                         | -                            |
| - маннита                    | + <sub>к</sub>            | +                | -                  | ±                  | ±                         | +                         | -                            |
| - инозита                    | -                         | -                | -                  | -                  | ±                         | ±                         | -                            |
| Рост на среде:               |                           |                  |                    |                    |                           |                           |                              |
| - без nacl                   | -/+                       | +                | +                  | +                  | +                         | -                         | +                            |
| - nacl (10%)                 | -                         | -                | -                  | -                  | -                         | +                         | -                            |

|                                    |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| <b>Образование декарбоксилазы:</b> |   |   |   |   |   |   |   |
| - лизина                           | - | - | - | + | + | + | ± |
| - орнитина                         | - | - | - | + | + | + | 0 |
| <b>Образование дегидроксилазы:</b> |   |   |   |   |   |   |   |
| - аргинина                         | ± | + | + | - | + | - | 0 |

**Примечания:**

- + - реакция положительная;
- - реакция отрицательная;
- +/- - реакция чаще положительная;
- /+ - реакция чаще отрицательная;
- ± - признак вариабелен;
- к - кислота;
- о - данные отсутствуют

Кроме того, полученные результаты используют для подразделения испытуемых культур на биотипы (таблица 2). Таблица 2 Характеристика биотипов *vibrio anguillarum*, выделенных от рыб

| Биотип | Маннит | Сахароза | Индол | Рост на среде без пачи |
|--------|--------|----------|-------|------------------------|
| a      | +к     | +к       | +     | -                      |
| b      | -      | -        | -     | -                      |
| c      | +к     | +к       | -     | +                      |
| d      | -      | +к       | +     | -                      |
| e      | -      | -        | +     | -                      |

**Примечания:**

- + - реакция положительная;
- - реакция отрицательная;
- к - кислота

7. Серологическое типирование вибрионов проводят в соответствии с действующим Наставлением по применению сыворотки агглютинирующей против *vibrio anguillarum*.

Диагноз на вибриоз считается установленным при положительном результате серологической идентификации возбудителя и наличии у рыб клинических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для данной болезни.

8. Серологическую диагностику вибриоза рыб проводят путем исследования сыворотки крови рыб в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) на стекле с диагностикумом, принятым в ветеринарной практике.

При получении положительных результатов исследования и наличии у рыб клинических и патологоанатомических изменений, характерных для данной болезни, а в случае бессимптомного течения при гибели рыбы, диагноз на вибриоз считается установленным.

**Приложение № 2 к Временной инструкции по борьбе с вибриозом рыб**

от 26 мая 1998 г. 1. Приготовление питательных сред Основной селективных и элективных питательных сред для культивирования и дифференциации вибрионов является мясо-пептонный бульон (МПБ) в состав которого входят: 50% мясной воды; 1% пептона; 0,5% хлористого натрия; 50% дистиллированной воды.

**1.1. Приготовление МПБ.**

Мясо крупного рогатого скота, полученное от животных средней упитанности, отделяют от жира, костей и сухожилий, пропускают через мясорубку. Фарш заливают дистиллированной водой из расчета 1:1, доводят до кипения и кипятят в течение 60 мин. После кипячения смесь доводят дистиллированной водой до первоначального объема, фильтруют через ватно-марлевый фильтр в стеклянные бутылки и

стерилизуют при 121°C (1 атм) в течение 60 мин. Мясную воду готовят впрок, содержание аминного азота в ней составляет 70-90 мг%.

К мясной воде, разведенной 1:1 водопроводной водой, прибавляют пептон и хлористый натрий. После их растворения к 20 см<sup>3</sup> бульона приливают из бюретки 10%-ный раствор соды или едкого натра до слабощелочной реакции. Соответствующим расчетом определяют количество щелочи, необходимое для подщелачивания оставшейся среды, и это количество щелочи вносят в МПБ. Проверив pH МПБ, его кипятят в течение 30 мин, разливают в емкости и стерилизуют при температуре 121°C (1 атм) в течение 20 мин.

1.2. Приготовление мясо-пептонного агара (МПА). К 1 литру МПБ прибавляют соответственно 20,0 грамм агара в волокнах или порошке и 7,5 грамм хлористого натрия, нагревают до растворения, устанавливают pH 7,2 - 7,4, осветляют, фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр и разливают в пробирки или флаконы. Для определения галофильности вибрионов применяют МПА, к которому перед стерилизацией добавляют 1,5; 3,0; 7,0; 10,0% хлористого натрия. Стерилизуют среду при температуре 121°C (1 атм) в течение 30 мин. Готовая питательная среда содержит 60-70 мг% аминного азота, pH 7,4-7,8.

1.3. Приготовление дифференциально-диагностического агара с пенициллином (среда ДДА).

К расплавленному щелочному МПА (pH 8,0 - 8,6), приготовленному из обычного МПА путем добавления 30 см<sup>3</sup> 10-процентного раствора углекислого натрия и кипячения в течение 45 мин, остуженному до 45-50°C, добавляют по 1,5% хлористого натрия и сахарозы. Устанавливают pH 8,0-8,2 и стерилизуют при температуре 110 -112°C (0,5 атм) в течение 15 мин. После остывания среды до 45-50°C в нее добавляют 1% бромтимолблау (1,6-процентного спиртового раствора) и пенициллин из расчета 5 ЕД/см<sup>3</sup>, перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри. Среду, имеющую сине-зеленый цвет, сохраняют при температуре 4 - 8°C и используют в течение 2 недель.

1.4. Среда Меллера состоит из пептона 5,0 г, мясной воды (1 кг мяса на 1 литр дистиллированной воды) - 5 см<sup>3</sup>, бромкрезолпурпура (1,6%) - 0,6 см<sup>3</sup>, крезолрога (0,2%) - 2,5 см<sup>3</sup>, d- глюкозы - 0,5 см<sup>3</sup>, пиридоксина - 5 мг (можно взять витамин b<sub>6</sub>), дистиллированной воды до 1000 см<sup>3</sup>. Учитывая галофильность вибрионов в среду добавляют 1%) хлористого натрия и устанавливают pH 6-6,2.

Для приготовления среды все компоненты растворяют в дистиллированной воде при нагревании, устанавливают pH среды 6,0 и разделяют на четыре части, в три из которых добавляют по одной аминокислоте - соответственно аргинин, орнитин, лизин. Если аминокислоты в l-форме, тогда достаточно 1%, если - в dl-форме - 2%. После добавления аминокислот, перед стерилизацией устанавливают pH 6,2. Среда разливают по 2-3 см<sup>3</sup> в пробирки и стерилизуют при температуре 121°C (1 атм) в течение 10 мин.

1.5. Среда с мочевиной (Кристенсена)

В состав среды входит: пептон - 1,0 г; фосфат калия однозамещенный - 2,0 г; хлористый натрий - 5,0 г; глюкоза - 1,0 г; агар -20,0 г; мочевины - 20,0 г; фенолрот - 0,012 г; дистиллированная вода 1000 см<sup>3</sup>, pH среды 6,8.

Промытый агар расплавляют в воде при нагревании. Затем в среду вносят пептон, соли, глюкозу, доводят ее до кипения и добавляют фенолрот, предварительно растворенный в растворе едкого натрия. Среду в объеме по 5 см<sup>3</sup> разливают в пробирки и стерилизуют при температуре 110-112°C (0,5 атм) в течение 20 мин. После охлаждения среды до температуры 50°C в каждую пробирку добавляют по 0,5 см<sup>3</sup> 20%-ного раствора мочевины (20 г мочевины растворяют в дистиллированной воде и кипятят 30 мин на водяной бане). Приготовленную среду скашивают. Цвет среды зеленовато-желтый. При защелачивании цвет среды меняется до красно-фиолетового.