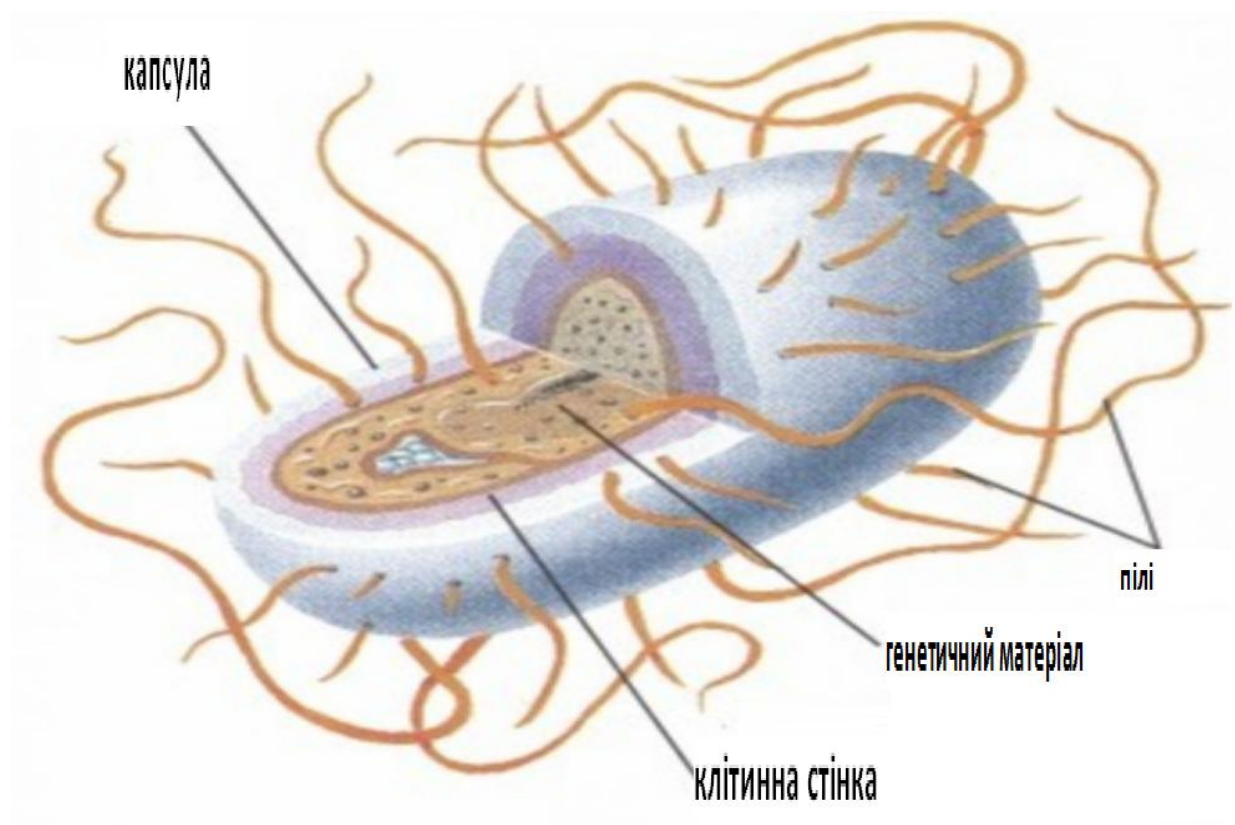


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
Кафедра мікробіології та вірусології

Методичні рекомендації з лекційного курсу вивчення дисципліни «Водна мікробіологія»



Біла Церква

2022

УДК 576.8(07)

Затверджено вченою радою
екологічного (Протокол №х від 08.2022)

Укладач: канд. **Рубленко І.О.** – доктор вет. наук, доцент

Водна мікробіологія: Методичні вказівки для студентів екологічного факультету, зі спеціальності 207 Водні біоресурси та аквакультура / Рубленко І.О. – Біла Церква – 2022 – 21 с.

Методичні рекомендації з лекційного курсу вивчення дисципліни «Водна мікробіологія» Методичні вказівки складені відповідно до програми з водної мікробіології.

Рецензент: **В. Скрипник**, доктор вет. наук, генеральний директор громадської спілки Українська асоціація виробників і дистриб'юторів ветеринарних препаратів та кормових добавок.

Лекція №1

Вступ. Предмет, завдання і роль мікробіології в народному господарстві та вирішенні загально біологічних проблем.

Перші відомості про бактерії – збудники хвороб людей, риб, тварин, рослин та мікроби, які беруть участь у кругообігу речовин у природі, зумовлюють процеси бродіння, продукують антибіотики, ферменти, вітаміни, гормони, токсини, синтезують білок, фіксують азот, виконують роль санітарів ґрунту, води, повітря, використовуються у медицині, сільськогосподарському та промисловому виробництві, зокрема у створенні повноцінної кормової бази. Вирішення загально біологічних проблем.

Мікробіологія – наука, що вивчає життя і розвиток мікроорганізмів, невидимих неозброєним оком.

Мікроорганізми. Розміри мікроорганізмів.

Перші відомості про бактерії – збудники хвороб людей, тварин, рослин та мікроби, які беруть участь у кругообігу речовин у природі, зумовлюють процеси бродіння, продукують антибіотики, ферменти, вітаміни, гормони, токсини, синтезують білок, фіксують азот, виконують роль санітарів ґрунту, води, повітря, використовуються у медицині, сільськогосподарському та промисловому виробництві, зокрема у створенні повноцінної кормової бази.

Історія виникнення та етапи розвитку мікробіології як науки. Відкриття мікроскопу А. Левенгуком. Роль відкриттів М. Терехівського, Д. Самойловича, Л. Пастера, А. Коха, І. Мечнікова, Д. Івановського, І. Ценковського, М. Гамалія.

Залежно від завдань мікробіологію поділяють на загальну та галузеву. Загальна вивчає систематику, морфологію, фізіологію, генетику, екологію мікроорганізмів. За застосуванням мікробіологію поділяють на такі науки: ветеринарну, медичну, технічну, с/г, ґрунту....

XVII ст. У 1590 р. в Голландії в м. Міддельбурзі шліфувальники скла брати Ганс і Захарій Янсени сконструювали прилад зі збільшувальних скелець, а в 1610р. Г. Галілей виготовив перший мікроскоп. У 1619 р. з'явився дволінзовий мікроскоп голландського фізика Кор-нелія Дреббеля. Голландський натураліст Антоні ван Левенгук (1632—1723). Петра I та виготовлення перших в Росії мікроскопів.

Перший період розвитку цієї науки, який увійшов в історію під назвою морфологічного періоду, був початком нагромадження фактичного матеріалу. Видатний природознавець К. Ліней (1707—1778). Датським природознавець О.Ф. Мюллер (1773 р.). Систематика К. Еренберга.

Другий – фізіологічний. Справжній переворот у мікробіології пов'язаний з ім'ям видатного французького природознавця, засновника сучасної мікробіології **Луї Пастера** (1822-1895). У 1857 р. – спиртова ферментація. У 1860 р. встановив, що мікроби поширені всюди... Термічна обробка рідин. «Чимало хвороб тварин і людини спричинюються мікроорганізмами». **30 квітня 1878** р. день народження науково обґрунтованої медичної мікробіології. Роль мікроорганізмів в етіології інфекційних захворювань, дослідження профілактичних щеплень (живих вакцин проти сибірки і сказу).

Роберт Кох (1843—1910). Відкриття збудників сибірки, туберкульозу, холери, виділення чистої культури бактерій на твердому поживному середовищі, забарвлення мікробів аніліновими барвниками, використання імерсійної системи і конденсора Аббе у мікроскопуванні, мікрофотографуванні. Способи дезінфекції. Тріада Генне-Коха, збудник туберкульозу (1882 р.) .

Важливим є вклад у мікробіологію і наших вітчизняних вчених: Л.С. Ценковського, І.І. Мечникова, С.М. Виноградського, Д.Й. Івановського, М.Ф. Гамалії, Д.К. Заболотного, М.С. Вороніна, В.Л. Омелянського, Б.Л. Ісаченка, Г.А. Надсона та багатьох інших.

Засновник вітчизняної школи мікробіологів є Л. С. Ценковський (1822—1887). «Про нижчі водорості та інфузорії». І. І. Мечникова (1845-1916): теорія фагоцитарного імунітету, вчення про антагонізм мікробів. Молочнокислі бактерії як антагоністи гнильних мікробів. П. Ерліх: теорія гуморального імунітету...

Діячі вітчизняної мікробіології: Г.Н. Габричевський, О.М. Безредка, М.Ф. Гамалія, І.Г. Савченко, Л.О. Тарасевич, Д.К. Заболотний, В.Л. Омелянський, М.Я. і Ф.Я. Чистовичі та багато інших.

М. Ф.Гамалія (1859-1949) явище бактеріофагії у паличок сибірки. Д.К. Заболотний (1866-1929) організував першу в світі кафедру епідеміології при Одеському медичному інституті, вивчав чуму, холеру, сифіліс, дифтерію, черевний й висипний тиф. Д.К. Заболотний – засновник Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Д.Й. Івановський (1864—1920), засновник сучасної вірусології. мозаїчну хворобу тютюну (1892 р), субмікроскопічні істоти – віруси. С.М. Виноградський (1856-1953) – мікроекологічний принцип, сіркобактерії, нітрифікуючі і залізобактерії, хемосинтез, кругообіг речовин у природі. Ф.М. Каменський (1880 р) – явища співжиття рослин із грибами (мікориза). М.С. Воронін (1886 р.) – явища співжиття рослин із бульбочковими бактеріями.

Виноградський (1893 р.): фіксація атмосферного азоту в ґрунті. М. Бейерінк (1851—1931) із ґрунту чисту культуру аеробних вільноживучих і симбіотичних азотфіксаторів — азотобактера і бульбочкових бактерій. В.Л. Омелянський (1867-1928): виділив у чисту культуру і вивчив фізіологію бактерій, які розкладають клітковину і пектинові речовини, що світяться та утворюють ароматичні речовини.

Третій напрямок – *біохімічний*. В.І. Палладіна (1859-1922), С.П. Костичева (1877-1931), В.С. Буткевича (1872-1942), пов'язані з дослідженням процесів дихання та бродіння мікроорганізмів та українських мікробіологів В.М. Шапошникова, М.Д. Ієрусалимського, Г.К. Скрябіна, Є.І. Квасникова, С.І. Кузнецова та інші.

Фундаментальні дослідження з морської, геологічної і сільськогосподарської мікробіології було проведено відомими вченими Б.Л. Ісаченком, А.О. Криссом, В.О. Таусоном, С.І. Кузнецовим, Є.М. Мішустіним та іншими.

Четвертий – молекулярної генетики. О. Ейвері, К. Мак-Леода, М. Мак-Карті, Дж. Ледерберга, Е. Татума, Н. Ціндера. Ф. Жакоба. генетика мікроорганізмів. Основа сучасної генної інженерії.

Завдання мікробіології на сучасному етапі. Роль інших дисциплін та зв'язок з ними (біотехнології, генної інженерії та ін.).

Лекція №2.

Морфологія мікроорганізмів.

Термін «морфологія бактерій» об'єднує їх у форму та будову. Систематика, номенклатура, ідентифікація. Класифікація: царство, відділ, секція, клас, порядок, родини, рід, вид, штам. Назви мікроорганізмів. Культура. Клон.

Визначення виду, визначники: "Определитель микроорганизмов" – Р.А. Ціона 1948р., "Руководство по систематике бактерий" – Д.Х. Бергі 1980р., 1984р., "Определитель бактерий и актиномицетов" Н.А. Красильникова 1949р., визначник К.Д.Е. Everett 1999 "порядок *Chlamydiales*", визначник Сидорова М.А., Скородумова Д.И., Федотова "Визначник зоопатогенних мікроорганізмів", комп'ютеризована і автоматизована ідентифікація мікроорганізмів програма "Систематика мікробіологічного моніторингу МІКРОБ" ("Мед проект-3").

Паличкоподібні мікроорганізми (краї бактерій, класифікація, розміщення спор, розміри, розташування). Коринебактерії та фузобактерії. Кулясті (форма, класифікація, розміщення, ділення, приклади). Звивисті (форма, класифікація, розмноження). Незвичайні форми бактерій (тороїдальні, зіркоподібні, простеки, червоподібні, тубероїдальні). Еукаріоти та прокаріоти.

Будова бактеріальної клітини (основні, тимчасові структури). Клітинна стінка. Цитоплазма, її організація, хімічний склад. Рибосоми. Цитоплазматичні включення. Структура і хімічний склад клітинних стінок у грамположитивних та грамнегативних бактерій. Протопласти і сфероласти, цитоплазматична мембрана, нуклеоїд. Плазмиди та інші носії поза хромосомної генетичної інформації, включення, рибосоми, мезосоми, хроматофори аеросоми, джгутики (типи джгутиків, рух, реактивний спосіб руху), пілі, спори (стадії процесу спорогенезу, будова та хімічний склад спор, стійкість). Капсули. Види капсул. Бактерій, синтез, хімічний склад, біологічне значення. Морфологія бацил родини *Bacillus*, *Clostridium*, *Plectridium*).

Лекція №3

Фізіологія мікроорганізмів.

Хімічний склад мікроорганізмів. Вода (зв'язана та вільна, кількість її) у спорах, вегетативних формах, молодих та зрілих. Зменшення води (висихання, загибель). Сухий залишок. Органічна частина сухого залишку (білки прості та складні, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та ліпіди).

Мінеральні речовини. Ферменти (екзо- і ендферменти, їх термолабільність і висока специфічність дії. Оптимальна температура.

Класифікація ферментів і біологічне значення. Стимулятори росту (активатори), вітаміни, токсини, пігменти – фізіологічно активні метаболіти.

Процеси живлення мікроорганізмів. Фактори, які впливають на надходження поживних речовин у мікробну клітину. Типи живлення (вуглецеве та азотне, автотрофи та гетеротрофи, фотосинтезуючі та хемосинтезуючі, фотоорганотрофи та міксотрофи).

Азотне живлення. Протеолітичні, дезамінуючі, нітритно-нітратні азотофіксуєчі мікроорганізми Роботи С.М. Виноградського.

Фактори, які впливають на надходження поживних речовин у мікробну клітину. Дифузія та обмінна адсорбція (метаболізм, тургор, плазмоліз, галофіти, плазмоптіз). Джерела азоту, вуглецю, зольних елементів та мікроелементів.

Сапрофіти, паразити, комерсали. Способи отримання мікроорганізмами енергії. Дихання – біологічне окислення різних органічних сполук і деяких

мінеральних речовин із виділенням теплової енергії у вигляді АТФ, АДФ. (аденозинтрифосфорна кислота).

Акумуляція енергії в мікробних клітинах. Термогенез, його роль в природі. Процес дихання мікроорганізмів (аеробіоз та анаеробіоз).

Облігатні аероби, мікроаерофільні бактерії, факультативні анаероби, облігатні анаероби. Хімізм та енергетика процесів бродіння. Значення в природі. Біосинтез білків, жирів, вуглеводів, нуклеїнових кислот.

Ріст і розмноження бактерій, їх фази розвитку (початкова, логарифмічного росту, стаціонарна, відмирання).

Методи культивування бактерій (аеробів, анаеробів), живильні середовища, їх класифікація, вимоги до них.

Культивування рикетсій, спірохет, грибів, мікоплазм, фотобактерій, ароматоутворюючих бактерій.

Лекція №4

Екологія мікроорганізмів

Поняття про екосистему і біоценоз. Будова екосистеми. Продуценти, консументи, редуценти. Екологічна ніша. Екотоп. Взаємозв'язок між компонентами біоценозів та фітоценозів. Вплив на якісний та кількісний склад мікробних асоціацій факторів зовнішнього середовища.

Мікрофлора ґрунту. Мікроорганізми признані основним фактором утворення ґрунту. Кількість і видовий склад мікробів у ґрунті змінюються залежно від внесення добрив, способів обробітку. Ефективність оброблення ґрунту виражається у показниках врожайності. У ґрунті можна зустріти бактерії, актиноміцети, плісняві, дріжджі, мікроскопічні водорості. Із бактерій особливо велика кількість, як було встановлено Виноградським, сапрофітні кулясті форми. До типових форм ґрунтової мікрофлори, окрім коків, належать: спороутворюючі аероби (*B. mycoides*, *B. subtilis*, сінна бацила, картопляна, капуста), спороутворюючі анаероби, термофільні (*B. thermophilus*, температурний оптимум =60°), пігментні (*B. flavum*, *B. fluorensens*), непігментні неспороутворюючі бактерії (*Proteus*, *B. aquatilis*). Непігментні неспороутворюючі бактерії у деяких ґрунтах складають =80–96% від всієї мікрофлори.

Із сапрофітних кулястих найбільш поширені: *Micrococcus albus*, *Micrococcus candidans*, *Micrococcus roseus*. Крім перерахованих у ґрунті знаходяться азотофіксуючі і денітрифікуючі, нітрофікуючі, сіркобактерії, целюлозорозщеплюючі мікроби. 1 г ґрунту містити сотні і тисячі мільйонів мікроорганізмів. Кількість їх коливається від сезону року (максимальна кількість – влітку, мінімальна – взимку), погоди, вологості, вмісту органічних речовин. Важливе місце в санітарній оцінці належить мікробіологічному дослідженню. Санітарно-мікробіологічне дослідження ґрунту проводиться при здійсненні попереджувального і поточного санітарного нагляду. Роль бактерій у синтезі гумосу. Патогенні бактерії, що поширюються ґрунтом (кишкової палички, сальмонели, збудники правцю, ботулізму, бацили сибірки (до 80 років), туберкульозу та ін.).

Мікрофлора води різних водоймищ. Загальний титр, колі-титр, колі-індекс.

Роль води у поширенні інфекційних хвороб. Мікробний планктон. Склад мікрофлори природних водоймищ. Переважаюча мікрофлора води річок, озер, ставків – сапрофіти. До них відносять: *Bacillus fluorescens*, *Bacillus aquatile*, *Micrococcus candidans*. Вміст анаеробних бактерій в чистих незабруднених водоймищах найчастіше виявляються: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, гриби роду *Clostridium*. Із сапрофітних бактерій в чистих водах переважають коки, у забруднених – палички, в тому числі спороутворюючі, патогенні анаероби. Так у річковій воді лептоспіри можуть перебувати = 150 діб, мікобактерії туберкульозу – 5 міс. Специфічна флора води.

Мікрофлора повітря. Основні екологічні фактори, які визначають забрудненість повітря мікроорганізмами. Сапрофіти, патогени, що поширюються повітрям. Санітарна оцінка чистоти повітря. З різних мікроорганізмів, що є у повітрі, найбільшу кількість становлять сапрофіти, але можуть зустрічатися і патогенні для тварин, людей, рослин.

Мікрофлора організму риби. Епіфітні мікроорганізми. Облігатна або нормальна, випадкова або тимчасова мікрофлора тіла риби. Мікрофлора шкірних похідного покриву. Нормальна мікрофлора тіла,

Мікрофлора травного каналу тварин та риби. Мікрофлора ротової порожнини. У залишках корму, що знаходиться у ротовій порожнині розмножується велика кількість мікроорганізмів – мікрококи, спірохети, мікоплазми, молочнокислі стрептококи і палички. У слині міститься лізоцим, який не дає розвитку стафілококам, хвороботворним стрептококам, тому навіть при пошкодженні слизової оболонки ерозії і рани швидко загоюються. Мікрофлора шлунку риб. Кислотостійкі мікроорганізми: молочнокислі бактерії, дріжджі, плісняві гриби, спори бацил і клостридії, мікобактерії туберкульозу, *B. anthracis*, *B. subtilis*, актиноміцети. Особливості складу мікроорганізмів. Целюлозоруйнівні мікроорганізми та їх значення у розщепленні клітковини. Аеробні бактерії та плісневі гриби. Динаміка мікрофлори травного каналу, умови утримання, годівлі та ін. Мікрофлора кишечника. У тонкому кишечнику не велика кількість за рахунок бактерицидної дії жовчі. В основному це: кишкова паличка, ентерококи, спори бацил і клостридії, ешеріхії, *Cl. perfringens*.

Лекція №5

Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води

Вода належить до природних середовищ, в яких існують мікроорганізми. У воді річок, відкритих водоймищ, морів, океанів виявляють представників усіх таксономічних груп: скотобактерії, фотобактерії, архібактерії, найпростіші, гриби, водорості. Мікрофлора водоймищ визначається особливостями даного водного середовища, оскільки різні водні мікроорганізми мають потребу в різних умовах існування.

Мікроорганізми, що пристосувалися до умов існування у воді і постійно знаходяться в ній, можна вважати специфічною для води флорою. До них відносять аеробні коки і бактерії (*Micrococcus candidans*, *Micrococcus roseus*, *Sarcina lutea*, бактерії: *Bacterium aquatilis communis*, *Pseudomonas fluorescens*. Роду *Proteus*; представники роду *Leptospira*. Вміст анаеробних бактерій у чистих незабруднених водоймищах незначний. Найчастіше виявляються

Serratia marsecens, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, мікроорганізми роду *Clostridium* та ін. Кількісні співвідношення мікроорганізмів і води відкритих водоймищ коливається в широких межах: від декількох десятків, сотень до мільйонів в 1 мл, що залежить від виду водоймища, ступеня його забруднення, зміни метеорологічних умов, пори року. Слід пам'ятати, що у воді водоймищ можуть міститися речовини, які перешкоджають розмноженню бактерій, можуть продукувати антибіотичні речовини або містити фаги. На дні, а також у прибережній зоні водоймищ виявляється велика кількість ґрунтових мікроорганізмів, які постійно потрапляють із ґрунту берега, з дощовою водою, із поверхневими стоками, тому флора будь-якого поверхневого водоймища періодично змінюється і оновлюється.

Кількісне і якісне співвідношення у біоценозах нестійке і змінюється залежно від вмісту органічних речовин, інших умов. Тобто змінюється на *сапробність* – співвідношення мікроорганізмів та органічних речовин у воді, що визначає ступінь мінералізації.

За шкалою сапробності розрізняють зони: полісапробні (зона сильного забруднення – мікробне населення дуже різноманітне, проте число видів обмежене і представлене переважно анаеробними бактеріями, грибами, актиноміцетами, що викликають гниття і бродіння), мезосапробні (зони помірного забруднення – загальна кількість мікроорганізмів – сотні тисяч в 1 мл, якісний склад – у більшості це нітрифікуючі бактерії – грамнегативні палички, коки, які є облігатними аеробами. Не менш важливою є участь водних мікроорганізмів – анаеробів роду *Clostridium*, бактерій роду *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Candida* у мінералізації вуглецевовмісних сполук –клітковина, лігнін), олігосапробні (зони чистої води – мікрофлора наближується до звичайної водяної флори, кількість бактерій від 10 до 100 в 1 мл води). Дослідження потребує вода: централізоване водопостачання; криниці; відкриті водоймища (річки, озера); плавальні басейни; стічні води

Основною метою санітарно-мікробіологічного дослідження є забезпечення тварин, населення якісною водою, для чого проводиться гігієнічна оцінка води інфекційної безпеки для здоров'я людей і тварин. Використовують загальне керівництво для підрахунку мікроорганізмів бактеріологічним методом (згідно з ISO 8199).

Основне правило методів дослідження проб води полягає у посіві певного об'єму проби води на тверде або рідке поживне середовище. Вважається, що за культивування мікроорганізми виростають у вигляді колоній, або ж спричиняють зміни у посіві в рідких середовищах. Вибір методу залежить від походження води, причини її дослідження, виду мікроорганізму, який виявляють у досліджених пробах.

Завданням санітарно-мікробіологічних досліджень є плановий санітарний нагляд за якістю питної води (централізованого і нецентралізованого водопостачання), державний санітарний контроль за якістю води у водоймищах, на очисних спорудах. Завдання досліджень залежить від характеру води, а частота лабораторних досліджень від стану водоймищ. Кількість проб встановлюється в прямій залежності від кількості тварин, людей, що користуються даним джерелом. Санітарний нагляд або лабораторно-виробничий контроль води проводиться на всіх етапах водопостачання. Одним

із завдань санітарно-мікробіологічного дослідження води є попередження їх виникнення спалахів інфекційних захворювань. У лабораторно-виробничий контроль за поверхневими водоймами входить дослідження і висновок про можливість використання водоймищ (для напування тварин, сільськогосподарських потреб), встановлення причин фекального забруднення, визначення можливості водоймища до самоочищення.

Основним завданням при санітарно-мікробіологічному дослідженні стічних вод є перевірка очищення і знешкодження стічних вод та їх осадів. Таким чином, санітарно-мікробіологічне дослідження проводиться: за вибору джерела централізованого господарсько-питного водопостачання і періодичного контролю; контролю ефективності знешкодження питної води централізованого водопостачання; при спостереженні за підземними джерелами централізованого водопостачання (артезіанські свердловини, ґрунтові води); визначення стану і ступеню придатності води джерел індивідуального водокористання (криниці); спостереженню за санітарно-епідеміологічним станом води відкритих водоймищ (водосховище, озер, річок); контролю ефективності знешкодження води басейнів; перевірки якості і ступеня очищення стічної води; розслідування водяних спалахів інфекційних хвороб. Під час санітарно-мікробіологічних досліджень води визначають: загальне число сапрофітних бактерій (загальне мікробне число); наявність БГКП, ЛКП, *E. coli*, ентерококів, стафілококів і патогенних мікроорганізмів (сальмонели, холерний вібріон, лептоспіри, шігели, ентеровіруси). Виділення сальмонел у воді свідчить про епідемічну небезпеку водного середовища. Ці показники досліджують залежно від завдань і характеру досліджуваного матеріалу.

Відбір, зберігання, транспортування проб і підготовка їх до дослідження. Для відбору проб використовуються склянки і колби місткістю 0,5 л. Посуд повинен бути закритий ватно-марлевым тампонами, забезпечений паперовими ковпачками, які обв'язують ниткою або тонким шпагатом, і простерилізований у сушильній шафі за температури 160 °С 1 год.

Для визначення якості води будь-якої ділянки водопроводу, що обслуговує окремий об'єкт (тваринницьку ферму, забійний цех, м'ясопереробне підприємство), водорозбірний кран заздалегідь обпалюють полум'ям тампоном змоченим у спирті, кран відкривають і протягом 20 хв спускають воду у каналізацію. Відбір проб хлорованої води проводять у банки, в які перед стерилізацією вносять 10 мг дехлоратора – сірчистокиислового натрію (на 500 мл води).

Паперовий пакет, або ковпачок знімають разом із корком безпосередньо перед відбором проби. Колби наповнюють з таким розрахунком, щоб під час транспортування корок не замочувався. У супровідному документі вказують: місцезнаходження джерела, час відбору проби, мету дослідження, обставини, які мали місце під час відбору проби, що можуть вплинути на результат аналізу, посада і прізвище фахівця, який відбирав проби.

Проби води із водоймищ беруть по 2–3 л кожна за допомогою батометра. Із поверхневих (на глибині 10–15 см від поверхні води) і глибинних шарів (не менше 30–50 см від дна) воду відбирають, не допускаючи її замулення ґрунтом так, щоб проба відповідала всій масі досліджуваної води. З ополонки проби беруть на глибині 10–15 см від нижньої поверхні льоду. Не можна проводити

відбір проб з берега, а тільки на віддалі 3–4 м від берега. Артезіанську і колодязну воду відбирають на глибині 10–15 см від поверхні води.

Джерельну воду беруть безпосередньо зі струмка або із середини джерела, яке витікає. Лід, що використовують на переробних і харчових підприємствах, відбирають одним куском вагою не менше 2 кг. У лабораторії лід обмивають стерильною водою і стерильними інструментами з глибини вирубують декілька кусочків так, щоб загальна маса була приблизно 500 г. Лід вносять у стерильний посуд і залишають за кімнатної температури до розтавання, після чого досліджують як воду.

Проби стічних вод також відбирають у стерильні банки. Проте, об'єм кожної проби може коливатися від 500 до 10 мл залежно від місця взяття (за перевірки окремих етапів очищення, після обробки) і від завдань аналізу. У деяких випадках для з'ясування джерела розповсюдження збудників інфекції доводиться досліджувати стічні води з лікарняних відділень або окремої ферми, переробленого закладу, бойні.

Транспортувати воду слід у сумках-холодильниках, або в ящиках з термоізоляційною прокладкою (температура в яких повинна бути не більше 1–2 °С), оберігати від різких поштовхів (щоб не замочити пробки), замерзання, дії сонячного проміння. Дослідження води слід проводити не пізніше 2-х год з моменту відбору проби, лише як виняток допускається зберігання проби до 6 год у холодильнику за температури 4–5 °С. У разі більш тривалого і неправильного зберігання може відбуватися розмноження або загибель водної мікрофлори, а також санітарно-показових і патогенних мікроорганізмів.

До сапрофітних бактерій, що населяють водоймища, відносять мезофільні і факультативні анаероби, що утворюють на живильному середовищі колонії, видимі за збільшення у 2–5 разів. Кількість мікроорганізмів, що виростають у вигляді колоній, відповідає ступеню забруднення води органічними речовинами, що характеризує стан води. Тому загальну кількість сапрофітних бактерій слід приймати як суттєвий показник санітарного стану.

Визначення загального мікробного числа

Визначення загального мікробного числа слід проводити методами серійних десятикратних розведень із посівом на МПА і методом прямого мікроскопічного підрахунку мікроорганізмів у досліджуваній воді. За дослідження методом серійних десятикратних розведень посіви культивують в залежності від мети досліджень за температури 37 °С протягом 24 год, або 20–22 °С – 48 год. Під час дослідження води централізованого і нецентралізованого водопостачання, джерел господарсько-питного водопостачання, басейнів проводиться визначення числа сапрофітних бактерій, що виростили за температури 37 °С протягом 24 год. Для вибору нового джерела водопостачання визначають дві групи сапрофітів, що ростуть за температури 20–22 °С протягом 48 год, і число сапрофітних мікроорганізмів, що ростуть за температури 37 °С протягом 24 год. За температури 20 °С виростає більшість сапрофітів і саме вони є найбільш активними учасниками процесу самоочищення водоймищ.

У місцях сильних забруднень стічними водами кількісне значення обох груп сапрофітів майже однакове, тому динаміка цього показника є чутливим індикатором забруднених водойм, особливо органічними речовинами. Для

визначення числа сапрофітів за двох температурних режимів роблять паралельно кожний посів на 2 чашки із середовищем (у 2-х повторностях).

Визначення загальної кількості мікроорганізмів прямим мікроскопічним методом було запропоновано ще в 1932 р А.С. Розумовим. На сьогодні визначають загальну кількість мезофільних і факультативних анаеробних мікроорганізмів (КМАФАнМ) у 1 мл води, за посіву води на поживний агар. Під час культивування протягом 24 год за 37 °С виростають колонії, видимі неозброєним оком, або у разі збільшення у 2 рази. Із кожної проби проводять посів не менше двох об'ємів по 1 мл. Для дослідження забрудненої води попередньо проводять розведення води з наступним посівом. Час від моменту приготування розведень і розливання поживного агару не повинен перевищувати 30 хв.

Методика посіву включає перемішування досліджуваної проби води, внесення по 1 мл у стерильну бактеріологічну чашку з наступним додаванням у кожну чашку 15 мл розплавленого і охолодженого до 45–50 °С живильного агару. Вміст чашок обережно, швидко, коливальними рухами змішують, не утворюючи пухирців повітря.

Посіви культивують, враховують лише ті чашки, на яких виросло не більше 300 ізольованих колоній. Результат виражають числом КУО (колонієутворювальна одиниця) в 1 мл досліджуваної води. Підрахунок колоній може проводитися за допомогою автоматизованих лічильників колоній.

Дослідження термостійких коліформних бактерій згідно ISO 9308

У воді визначають і підраховують кількість коліформних мікроорганізмів, термостійкі коліформи і наявність *E. coli* після фільтрування через мембрани та культивуванням на диференційних живильних середовищах із лактозою. Серійні розведення води фільтрують через мембранні фільтри №3 збагачені тіповим бульйоном, чи мембрани з лаурилсульфатом, які викладають на селективне лактозне середовище з лактозою (лактозоТТС агарове середовище, лактозний агар із тергітолом, Ендо). Культивують на середовищі Ендо за температури 37 °С протягом 24 год – для виявлення коліформних мікроорганізмів. За температури 44 °С протягом 24 год на середовищі МФС – для виявлення коліформних та коліформних термостійких мікроорганізмів.

На лактозоТТС агаровому середовищі з тергітолом виростають під мембраною колонії жовтого, помаранчевого, цегляно-червоного кольору. На лактозному агарі з тергітолом – жовтий центр під мембраною. На Ендо – колонії темно-червоного кольору з металевим блиском.

Для підтвердження результатів коліформних бактерій (із питної води) пересівають типові колонії у пробірки з лактозо-пептонною водою, культивують за температури 37 °С протягом 48 год на газоутворення. Для дослідження *E. coli* та термостійких коліформних бактерій проводять пересів у пробірки із лактозо-пептонною та триптоною водою. Позитивна реакція наявності термостійких коліформних мікроорганізмів – утворення газу.

Для *E. coli* – утворення червоного забарвлення на поверхні триптонової води після додавання 0,2 мл реактиву Ковака. Для диференціації *E. coli* від бактерій виду *Aeromonas* проводять реакцію на оксидазу шляхом нанесення 2–3 крапель реактиву оксидази (свіжоприготовленого) на фільтрувальний папір у

бактеріологічній чашці. На нього нанести культуру. У позитивних випадках – поява у глибині блакитно-фіолетового забарвлення.

Визначення ентерококів, стафілококів

Під час **визначення ентерококів** звертають увагу на бактерії фекального забруднення. У ґрунті вони зберігаються до 6 тижнів, але не розмножуються і не змінюють свої біологічні властивості. Виживання ентерококів у воді майже таке, як і в патогенних ентеробактерій. Вони стійкі до підвищених температур (нагрівання за температури 55–60 °С витримують протягом 1 год), добре переносять низьку температуру, стійкі до хлору. Ентерококи визначають у разі підозри на свіже фекальне забруднення, коли індекс ЛКП і число *E. coli* дорівнюють 500 і 1000 в 1 л води. Визначення ентерококів проводять методом мембранних фільтрів, титраційним, а за сильного забруднення води (більше 30 бактерій в 1 мл) – метод прямого посіву.

Стафілококи є показником забруднення води мікрофлорою поверхневих дихальних шляхів і шкіряних покривів тварин, людей (хоч і не виключено потрапляння їх у воду із кишечника). Сигналом слугує наявність стафілококів більше 100 в 1 л. Стафілококи у воді визначаються 1 із 3 методів: методом мембранних фільтрів, прямим посівом, або титраційним.

Визначення кількості лактозопозитивних *E. coli*

Бактерії групи *E. coli* у воді – показник фекального забруднення, а їх кількість – ступінь цього забруднення. Визначення бактерій групи *E. coli* проводять методом мембранних фільтрів та бродильним методом.

Метод мембранних фільтрів використовується для дослідження чистої води. Суть методу полягає у концентрації бактерій із досліджуваної проби води на мембранному фільтрі та культивуванні на середовищі Ендо за температури 37 °С протягом 16–18 год із наступною диференціацією колоній, підрахунку в 1 л води кількості бактерій. За відсутності будь-яких колоній на фільтрах №3, або за наявності не характерних для *E. coli* колоній результат негативний. За наявності на фільтрах колоній, характерних для *E. coli* (темно-червоних з металевим блиском або без нього, рожевих, прозорих), із декількох колоній готують мазки, фарбують за Грамом і проводять мікроскопію. У разі виявлення в мазках відсутності грамнегативних неспорівих паличок – результат негативний. За наявності в мазках грамнегативних, коротких поліморфних, які не утворюють спор, паличок, ставлять оксидазний тест для диференціації бактерій родини *Enterobacteriaceae* від родини *Pseudomonadaceae* та інших спорівих бактерій.

Визначення колі-індексу. Результат виражають кількістю бактерій *E. coli* в 1 л води. Колі-індекс вираховують таким чином: кількість бактерій групи *E. coli*, що виростили із досліджуваного об'єму води, перемножують на 1000 мл і ділять на об'єм води. За відсутності на фільтрах бактерій групи *E. coli* колі-індекс буде меншим тієї величини, яка була б визначена у випадку виявлення в дослідному об'ємі однієї клітини *E. coli*. Для підрахунків колі-індексу у пробах незнезараженої води з більшим фекальним забрудненням, коли для аналізу профільтровано об'єм менше 10 мл, або її розведення, для обліку вибирають той фільтр, на якому виростило не менше 10 і не більше 30 ізольованих колоній *E. coli*. Кількість колоній на ньому, віднесених до бактерій групи *E. coli*, перераховують на 1 л з урахуванням лише того об'єму води, який профільтрований. Для

водопровідної води колі-титр становить не менше 333, а для води відкритих водоймищ – не менше 111 мл.

Бродильний метод. Даним методом досліджують мутну воду. Проводять посів дослідної води і підрощують при 37 °С у середовищах накопичення з наступним пересівом на середовище Ендо, після чого проводять диференціацію вирослих бактерій та визначають число *E. coli* в 1 л води за таблицями 1, 3, 4. Водопровідну воду засівають по 100 мл, по 10 мл та по 1 мл.

Дослідну воду вливають у колби з лактозопептонним, або глюкозопептонним середовищем (середовища нормальне і концентроване). Посів 100 і 10 мл води проводять у колби відповідно з 10 і 1 мл концентрованого середовища; посіви 1 і 0,1 мл дослідної води проводять у пробірки з 10 мл середовища нормальної концентрації, після чого культивують у термостаті за температури 37 °С на 24 год. Відсутність помутніння й утворення кислоти і газу в колбах і пробірках – негативний результат. У разі виявлення змін (помутніння, утворення кислоти та газу) потрібно впевнитись, що вони викликані бактеріями групи *E. coli*, тому проводять пересів петлею в бактеріологічні чашки на 3–4 сектори середовища Ендо, для отримання ізольованих колоній. Посіви культивують у термостаті за 37 °С. За відсутності росту колоній на секторах середовища Ендо, а також за наявності нехарактерних для *E. coli* колоній, дають негативну відповідь. Якщо під час пересівів із пляшечок і пробірок, в яких було помутніння, кислота і газ, на середовищі Ендо виросли темно-червоні з металевим блиском і без нього колонії, проводять мікроскопію мазків із цих колоній і ставлять оксидазний тест.

Постановка оксидазного тесту. Бактеріологічною петлею знімають по 2–3 ізольованих колонії та наносять їх штрихом на фільтрувальний папір, зволожений реактивом (30–40 г α -нафтолу розчиняють у 2,5 мл ректифікованого етилового спирту, додають 7,5 мл дистильованої води, 40–60 г дим етил-фенілендіаміну). Якщо реакція негативна, то на місці нанесення бактеріальної маси папір не змінює кольору, якщо реакція позитивна – папір синіє (протягом 1 хв). За наявності у мазках грамнегативних паличок і негативний оксидазний тест – позитивний результат. Для дослідження питної води також враховують сектори, на яких виросли лише рожеві та безбарвні колонії, а також ті, де темно-червоні колонії дали позитивну реакцію на оксидазний тест. Із 2–3-х колоній кожного сектора готують мазки, фарбують їх за Грамом і проводять мікроскопію. За наявності лише грампозитивних спороутворювальних бактерій – негативний результат. Результати аналізу виражають у вигляді колі-індексу, величину якого визначають за таблицями.

Визначення колі-титру шляхом посіву суспензії досліджуваного матеріалу на середовище Кода (прискорений метод). Проводиться шляхом трьохрядного посіву проб води загальним об'ємом 333 мл (3 по 1 мл, 3 по 10 мл, 3 по 100 мл). Готують необхідну кількість концентрованого середовища КОДА для посіву проб води об'ємом 10 і 100 мл. У колби об'ємом 250 мл вносять 50 мл середовища КОДА, 100 мл дослідної води, у колби об'ємом 100 мл – 5 мл середовища КОДА та 10 мл дослідної води. У колбу об'ємом 10 мл вносять 5 мл середовища КОДА звичайної концентрації та 1 мл дослідної води. Інкубують за температури 37 °С 24 год. Зміна середовища – помутніння, зміна кольору до світло-зеленого чи жовтого вказує на наявність у досліджуваній воді мікроорганізмів групи кишкової палички, після чого можна визначити колі-титр та колі-індекс води, використовуючи табл. 1.

Таблиця 1 – **Визначення коли-індексу у разі дослідження 300, 30, 3 мл води**

Кількість позитивних результатів дослідження води із 3-х:			Колі-індекс	Межі індексу		Колі-титр
флаконів по 100 мл	пробірок по 10 мл	пробірок по 1 мл		нижня	верхня	
0	0	0	менше 3	–	–	більше
0	0	1	3	0,5	9	333
0	1	0	3	0,5	13	333
1	0	0	4	0,5	20	333
1	0	1	7	1	21	250
1	1	0	7	1	23	143
1	1	1	11	3	36	143
1	2	0	11	3	36	91
2	0	0	9	1	36	91
2	0	1	14	3	37	111
2	1	0	15	3	44	72
2	1	1	20	7	89	67
2	2	0	21	4	47	50
2	2	1	28	10	149	48
3	0	0	23	4	120	86
3	0	1	39	7	130	43
3	0	2	64	15	379	26
3	1	0	43	7	210	16
3	1	1	75	14	230	23
3	1	2	120	30	380	13
3	2	0	93	15	380	8
3	2	1	150	30	440	11
3	2	2	210	35	470	7
3	3	0	240	36	1300	5
3	3	1	460	71	2400	4
3	3	2	1100	150	4800	2
3	3	3	більш 1100	–	–	0,9 більше 0,9

Питна вода хорошої якості (табл. 2–5) в 1 мл загальна кількість бактерій – не більше 50 колонієутворювальних одиниць (КУО); сумнівної якості – КУО більше 50. Кількість мікроорганізмів у придонному шарі мулу озер та річок коливається в межах від 100 до 400 клітин в 1 г.

Таблиця 2 – **Санітарна оцінка води**

Згідно з вимогами державного стандарту	Колі-індекс (кількість БГКП) в 1 л води	Колі-титр
Централізованого водопостачання	не більше 3	не менше 300
Шахтних колодязів	не більше 10	не менше 100

Відкритих водоймищ	не більше 10	не менше 100
Артезіанська	не більше 10	не менше 100

Таблиця 3 – **Визначення коли-індексу у разі дослідження 500 мл води**

Кількість позитивних результатів дослідження води із 5 пляшечок по 100 мл	Колі-індекс	Межі індексу		Колі-титр
		нижня	верхня	
0	менше 0	0	6,0	більше 455
1	2	0,1	12,6	455
2	2	0,5	19,2	196
3	5	1,6	29,4	109
	9			

Таблиця 4 – **Визначення коли-індексу у разі дослідження води за стадіями очищення**

Об'єм досліджуваної води				Колі-індекс	Колі-титр
100	10	1,0	0,1		
–	–	–	–	менше 9	більше 111
–	–	+	–	9	111
–	+	–	–	10	105
+	–	–	–	23	43
+	–	+	–	94	10
+	+	–	–	230	4
+	+	–	+	960	1
+	+	+	–	2380	0,4
+	+	+	+	більше 2380	менше 0,4

Умовні позначення: + – наявність бактерій; – відсутність бактерій.

Таблиця 5 – **Розрахунок числа бактерій в 1 л води у разі дослідження стічної води**

Об'єм дослідженої води, мл				Число бактерій в 1 л
0,1	0,01	0,001	0,0001	
–	–	–	–	більше 9000
–	–	+	–	9000
–	+	–	–	10000
+	–	–	–	23000
+	–	+	–	94000
+	+	–	–	230000
+	+	–	+	960000

Умовні позначення: + – наявність бактерій; – відсутність бактерій.

Визначення бактерій роду сальмонел

Дослідження води на сальмонели проводять у разі несприятливої санітарно-епізоотологічній ситуації, а також перевищення норми коли-індексу. Суть методу полягає у використанні методів накопичення патогенних ентеробактерій у середовищах накопичення (Мюллера і селенітовий бульйон) з наступним пересівом на щільні селективні і диференціальні середовища, а потім вивчають їх біохімічні властивості і серологічну ідентифікацію. 1 л води ділять на 2 частини по 500 мл. Кожну частину вносять у 2 середовища накопичення, культивують у термостат протягом 18–20 год, за температури 37 °С, потім бактеріологічною петлею пересівають на бактеріологічні чашки із вісмут-сульфітним агаром (культивують протягом 48 год за 37 °С). Далі досліджують за загальною схемою (рис. 1). У разі виділення сальмонел цю воду не можна використовувати як джерело водопостачання.

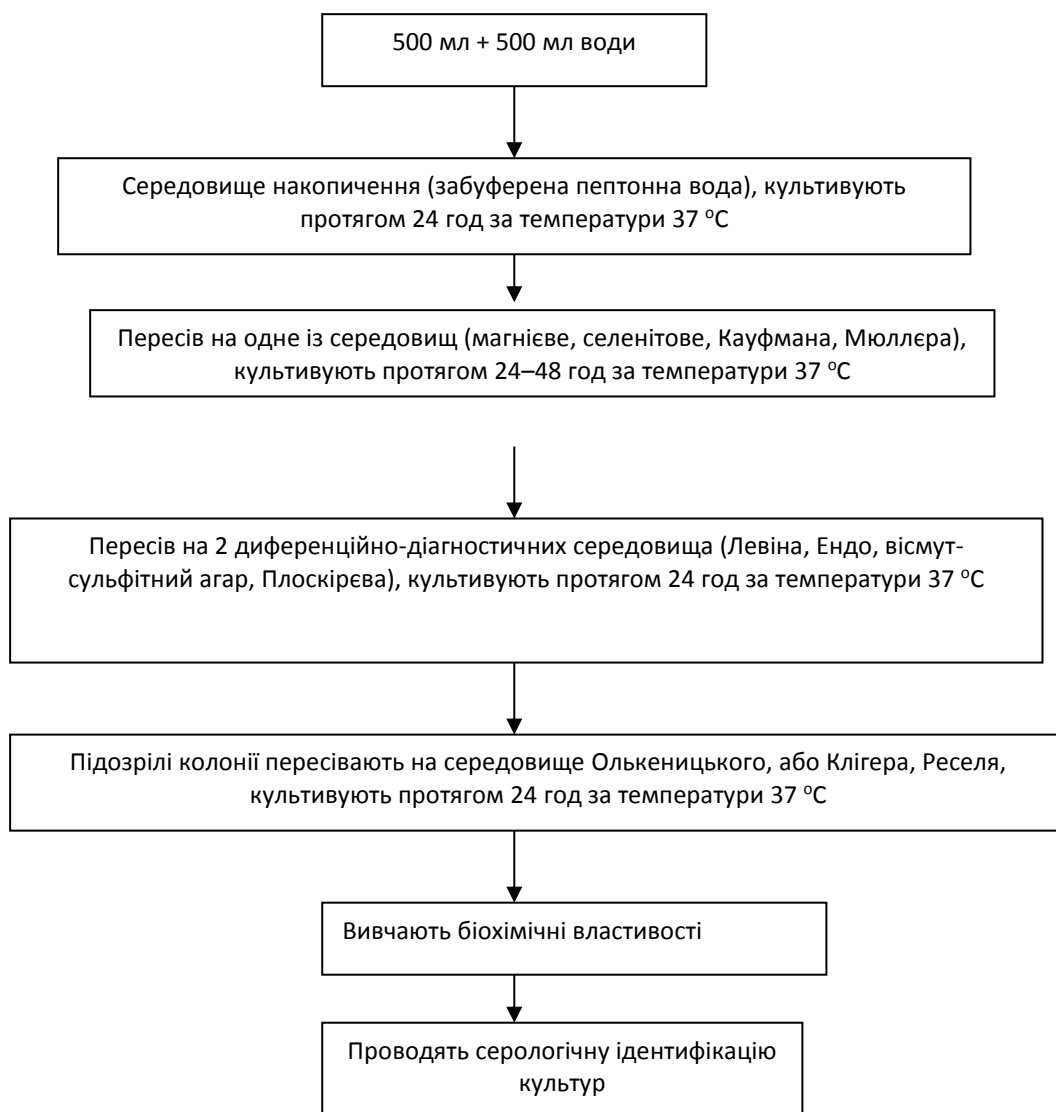


Рис. 1. Схема дослідження сальмонел у воді

Визначення токсичності води

Відбір води проводять у загальній кількості 2–3 л, на глибині 30–50 см від поверхні водоймища, у товщі шарів, на течіях, перепадинах, водоспадах, водоспусках, на місці загибелі гідробіонтів. При цьому слід враховувати тимчасову каламутність, випадкове забруднення. У ветеринарних лабораторіях із надісланої проби відбирають по 2 мл дослідної води і розливають у 3 флакони, у кожний з яких додають по 0,04 мл тридобової культури інфузорій (*Fetzumena rugiformis*), вирощених на пептонному середовищі. Одночасно ставлять контроль: дослідну воду замінюють 8 мл 0,56 % розчину аптечної морської солі та відстояна нетоксичною водою водоймища. Флакони струшують і культивують посіви за температури 25 °С протягом 24 год (струшуючи для аерації 3–4 рази).

Результат враховують через 1, 2, 4, 6, 24 год. Для фіксації інфузорій у флакони вносять по 0,04 мл (одній краплині) 5 % спиртового розчину йоду. Відбір краплі дослідної рідини проводять пастерівською піпеткою. Досліджують під мікроскопом, використовуючи камеру Фукс-Розенталя. Наявність неживих клітин, уповільнений або припинений рух інфузорій, пригнічення їх росту, розмноження свідчатиме про токсичність досліджуваної води.

За великої кількості інфузорій – більше 100 клітин у полі зору, культуру розводять у 5–10 разів стерильним 0,56 % розчином аптечної морської солі. Підраховують середню кількість клітин квадраті (табл. 6), враховуючи розведення (середню кількість підрахованих інфузорій перемножують на ступінь розведення).

Таблиця 6 – **Визначення середньої кількості інфузорій за допомогою камери Фукс-Розенталя**

Порядковий номер проби	Послідовність проби	Кількість клітин інфузорій у квадратах камери										Середнє арифметичне кількість б.к. у одному квадраті	Середня кількість інфузорій із 3-х повторностей проб
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	1	30	35	33	29	34	41	38	36	39	41	35,60	34, 23
	2	29	28	26	20	23	26	26	28	28	20	32,60	
	3	25	26	28	26	23	24	25	26	27	25	34,50	

Потім кількість інфузорій що вирости у 1 мл досліджуваної культури ділять на 2 і перемножують на 10^4 .

Вирощування культури інфузорій. Культуру *Fetzumena rugiformis* вирощують на стандартному середовищі, до складу якого входить дистильована вода рН 7,0–7,5 100 мл, бактеріологічний пептон 2 г, аптечна морська сіль 0,1 г. Для стерилізації 1,5 мл середовища поміщають у колбу Ерленмейера (об'ємом на 50 мл) і витримують протягом 30 хв у автоклаві за 0,5 атм або ж апараті Коха протягом 3-х діб по 15 хв. До стерильного середовища у колбу додають по 0,1 мл культури, культивують за температури 25 °С протягом 4–7 діб (дозволяється культивувати за кімнатної температури у темній шафі). Зберігають культуру у консервованому вигляді: 1) у 1 % розчину глюкози (10 мл глюкози додають до 0,5 мл культури), за кімнатної температури протягом 2 міс.; 2) 4-добову культуру висівають у 5–8 мг аптечного ліпоцеребрину, протягом 3–4 міс. за температури 4–5 °С.

Лекція №6 Вчення про інфекцію та імунітет.

Визначення понять «інфекція» та «інфекційна хвороба». Мікроорганізми, що викликають інфекційний процес називаються збудниками.

Інфекційний процес може проявлятися у тварин, людей на молекулярному, субклітинному, тканинному, органному, організменому рівні розвитку. Він може викликати складні типові пат зміни: запалення, лихоманку, гіпоксію, порушення обміну речовин. Збудник визначає виникнення інфекційного процесу, його специфічність, впливає на перебіг і кінець.

Збудниками інфекційних хвороб можуть бути представники різних типів і класів мікроорганізмів: простіші, бактерії (в тому числі мікоплазми, рикетсії), хламідії, віруси. Ці мікроорганізми називаються ще інфекційними агентами і є обов'язковими причинами виникнення інфекційного процесу.

Стан макроорганізму та вплив умов зовнішнього середовища на виникнення і розвиток інфекційного процесу. Особливості інфекційного захворювання. Перебіг інфекційного процесу (безсимптомно, скрито, латентно). Імунізуюча субінфекція.

Інфекційний процес розвивається періодично: інкубаційний період, → продромальний, → клінічний (прояв хвороби), → одуження (реконвалесценція).

Бактеріоносійство. Резистентні тварини. Специфічна особливість інфекційного процесу (життя мікроорганізму в макроорганізмі). Характер симбіозу (мутуалізм, коменсалізм і паразитизм) або антагонізму. Патогенні мікроорганізми. Факультативні і облігатні паразити.

Ворота інфекцій. Екзогенна інфекція. Ендогенна інфекція. Експериментальні інфекції. Спонтанна інфекція. Залежно від шляху зараження інфекції: респіраторні, аліментарні, контактні, венеричні, ранові, трансмісивні. Динаміка інфекційного процесу. Форми інфекції: ензоотія, епізоотія, панзоотія.

Поняття про бактеремію, септицемію, віремію, токсікомію, мікробоносійство, мікробовиділення. Види інфекцій: моноінфекція, суперінфекція, реінфекція, вторинна інфекція (секундарна), реінфекція, токсікоінфекція (екзотоксини, гемотоксин, нейротоксин, некротоксин, ентеротоксин; ендотоксини: гіалуронідаза, фібринолізин, колаген аза, нейтрамінідаза, лецитинази, керетиназа). Агресини. Інфекція спорадична. Ензоотії.

Джерело інфекції. Резервуар інфекції. Природні вогнища інфекції. шляхи поширення збудників інфекційних хвороб у організмі. Патогенність. Вірулентність. Мінімальна смертельна доза – D_{lm} (Dosis letalis minima). Безумовна смертельна доза – D_{cm} (Dosis certa minima). ID – інфекційна доза. Інфікована доза. Тропність до певних тканин, систем чи клітин.

Хронічні захворювання. Характеристика збудників: патогенність, вірулентність, агресивність. Фактори вірулентності. Інвазивність. Адгезивність. Резистентність. Неспецифічна резистентність.

Імунітет. Види імунітету. Видовий імунітет. Імунна відповідь організму. Імунна система організму та імунна реакція. Індивідуальні властивості. Показник захворюваності, смертності, летальності. Імунодефіцитний стан. Природна резистентність організму. Клітинний і гуморальний імунітет. Основні механізми неспецифічного захисту: фагоцитоз, природні антитіла, комплемент, лізоцим, інтерферон. Механізм антитіло утворення.

Лекція №7

Інфекційні хвороби риб.

Віруси. Класифікація вірусів. Коротка характеристика Норовірусу

Норовіруси (NoV) визнані новим емерджентним збудником захворювань із харчовим шляхом передачі, який викликає більшу кількість спалахів, ніж всі інші відомі бактеріальні, вірусні та протозойні разом узяті. У зв'язку з високою контагіозністю, низькою інфікуючою дозою і здатністю персистувати у зовнішньому середовищі вони класифікуються як потенційні біологічні агенти (БПА) – об'єкти біотероризму групи Б.

Назва норовірусів (*Norwalk virus*) походить від спалаху гастроентериту 1968 р в початковій школі м. Норволк штату Огайо в США. Штами, виділені при цьому спалаху, стали прототипом для цілої групи під назвою "Norwalk-like віруси". Вони також називалися по географічній локалізації, де викликалися спалахи, наприклад: "Гаваї вірус", "Брістоль вірус", "Мінерва вірус". Надалі, норовірусам було запропоновано назвати за формальної схемою: вид інфекції / рід вірусу / геногрупи / найменування вірусу / місце виділення штаму / рік детекції / країна.

Норовірус (рис. 1.1) містить одноланцюгову молекулу РНК (рис. 1.2), відносяться до сімейства *Caliciviridae*. Рід норовірусів включає в себе більше 40 різних штамів, які поділяються на 7 геногрупи. Віруси геногрупи III і V викликають ураження шлунково-кишкового тракту у великої рогатої худоби і деяких видів гризунів. Геногрупи VI, VII включають поки тільки поодинокі ізоляти, виділені від людини. Віруси, що входять до складу геногрупи I, II, IV, викликають захворювання у людини. Геногрупи II зустрічається в 10 разів частіше за інших, в її складі ідентифікують 23 генотипу.

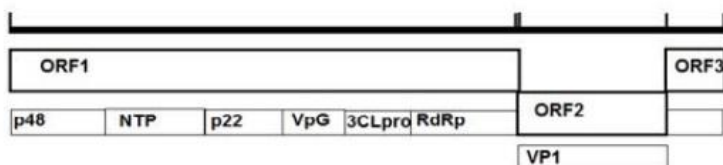


Рис. 1.1. Діаграма геномної організації Норовірусу

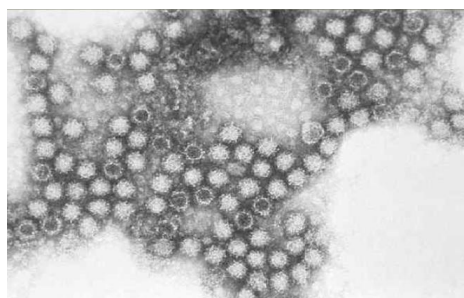


Рис. 1.2. Фотографія Норовірусу, яка була зроблена за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа

Інфекції, що викликаються норовірусами (НВІ), характеризуються коротким інкубаційним періодом і клінічними симптомами, властивими для більшості кишкових вірусів: сильною блювотою, нудотою, діареєю, спазмами, ознобом, болем у м'язах і головним болем.

Норовірусна інфекція передається, в першу чергу, фекально-оральним шляхом, або безпосередньо від людини до людини, а також через контаміновані їжу і воду. Вірус може існувати протягом декількох днів на різних поверхнях, в

тому числі на одязі, шкірних покривах, обладнанні та інших предметах, що контактують із носіями інфекції. Повітрянокрапельний шлях передачі пов'язаний із присутністю вірусу в блювотних масах і відіграє істотну роль у забрудненні середовища, особливо в замкнених колективах і приміщеннях, наприклад: на пасажирських судах, у готелях, клініках, військових казармах, дитячих таборих і ін.

Норовірусні спалахи часто бувають пов'язані з вживанням інфікованої сирової їжі і готових до вживання продуктів, заражених шляхом вторинної контамінації при контакті з персоналом підприємств, де готується їжа, або від випадкових вірусоносіїв. З інших джерел інфікування найбільш відомі питна вода, іригаційні системи поливу фруктів і овочів, а також заражені в акваторіях молюски та інші морепродукти.

Інфекції, що викликаються норовірусами, – це антропозоонозні гострі захворювання з убіквітарним поширенням і високою природною сприйнятливістю людей будь-якого віку; при спалахах захворюють від 20 до 90 % людей, які контактували зі збудником і зазнали ризику зараження. З огляду на високу контагіозність норовірусів, санітарно-гігієнічні заходи слід здійснювати в суворій відповідності з діючими правилами для попередження поширення гострих кишкових інфекцій.

Незважаючи на відкриття норовірусів людини більше чотирьох десятиліть тому, до цих пір немає схвалених вакцин і антивірусних препаратів проти цієї інфекції. У даний час триває розробка вакцин, проте вона сильно утруднена через швидку генетичну мінливість норовірусів і їх схильності до «ухилення» від імунної відповіді, що сприяє низькій імуногенності вакцини.

Молюски, як один із варіантів зараження Норовірусом

Норовіруси, також відомі як Норволкподібні віруси та каліцивіруси людини, є генетично різноманітною групою вірусів РНК родини *Caliciviridae* і є найбільш поширеними причинами епідемічного гастроентериту в розвиненому світі.

У більшості спалахів норовірусу поширюються від людини до людини, але забруднені продукти харчування та вода також є важливими засобами передачі. Основною причиною спалахів норовірусної інфекції, що переноситься харчовими продуктами, є передача від харчових продуктів, але забруднені водопровід та молюски (зокрема, устриці) також були пов'язані з великими спалахами.

Згідно з даними ФАО ООН (Food and Agriculture Organization of the United Nations) двостулкові молюски, які харчуються шляхом фільтрації води, такі як, наприклад, устриці, мідії і гребінці однозначно брали участь в ряді спалахів вірусних захворювань харчового походження. Ряд вірусів людини був виявлений у цих гідробіонтів в кишковому тракті (рис. 1.3).

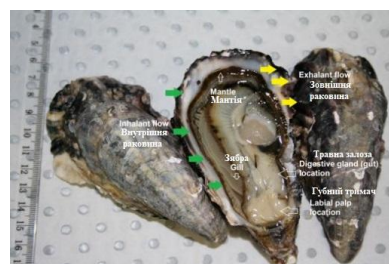


Рис. 1.3 Анатомічний склад Тихоокеанської устриці

Вірусні патогени можуть накопичуватися в устрицях (рис. 1.4), коли вони адсорбуються на їжу устриць або зважені частинки і переносяться в травну систему устриць під час харчування цих молюсків шляхом фільтрації морської води.

На характеристики процесу біоаккумуляції можуть впливати такі фактори навколишнього середовища, як температура і солоність, або фізіологічний стан устриць, наприклад, розмір і вік. Великі устриці здатні фільтрувати великі об'єми води, таким чином потенційно такі устриці можуть накопичити в собі більшу кількість патогенних вірусів із забруднених вод.



Рис. 1.4 Шляхи зараження марикультури двостулкових молюсків на різних стадіях розвитку: товщина ліній вказує на кореляцію з частотою зараження вірусами на тій чи іншій стадії розвитку марикультури

Устриці є фідерними живильниками і, отже, можуть концентрувати віруси, якщо їх вирощують у фекально забруднених водах. Спалахи норовірусної інфекції, пов'язані із споживанням устриць, спричинені харчовими продуктами, трапляються у багатьох країнах, незважаючи на стратегію запобігання зараженню районів, які вирощують устриці. Більшість спалахів були наслідком споживання сирих устриць, хоча також були причетні варені устриці.

Відомо, що віруси, які заражають людини, не заражають молюсків і не реплікують в них, але зберігаються в їх зябрах і травному тракті досить тривалий час, залишаючись в інфекційному стані протягом багатьох днів і навіть тижнів. Устриці – це не просто пасивні фільтри, але вони використовують специфічні ліганди для вибіркового накопичення NoV. Вважається, що штами GI та GII NoV зв'язуються з A-подібними антигенами в травній тканині, що полегшує їх накопичення в устрицях. Це специфічне зв'язування може допомогти пояснити їх тривале утримання, як це спостерігалось у дослідженнях по очищенню та повторному дослідженню на сьогоднішній день, та врахування спалахів хвороби, що відносяться до очищених устриць. Одним з основних факторів, що сприяють зараженню людини патогенними для нього вірусами, є вживання в їжу молюсків в сирому

або слабо термічно обробленому вигляді. На цю обставину звертають увагу практично всі автори, в чиїх роботах обговорюються проблеми інфікування людей вірусами, що передаються через морепродукти, перш за все, молюсків.

Контамінація водного середовища збудниками хвороб відбувається різними шляхами (рис 1.5): при спуску у водойми стічних вод каналізації, пранні білизни, водопої худоби, при інтродукції в акваторію і прибережну зону інфікованих тварин і птахів.

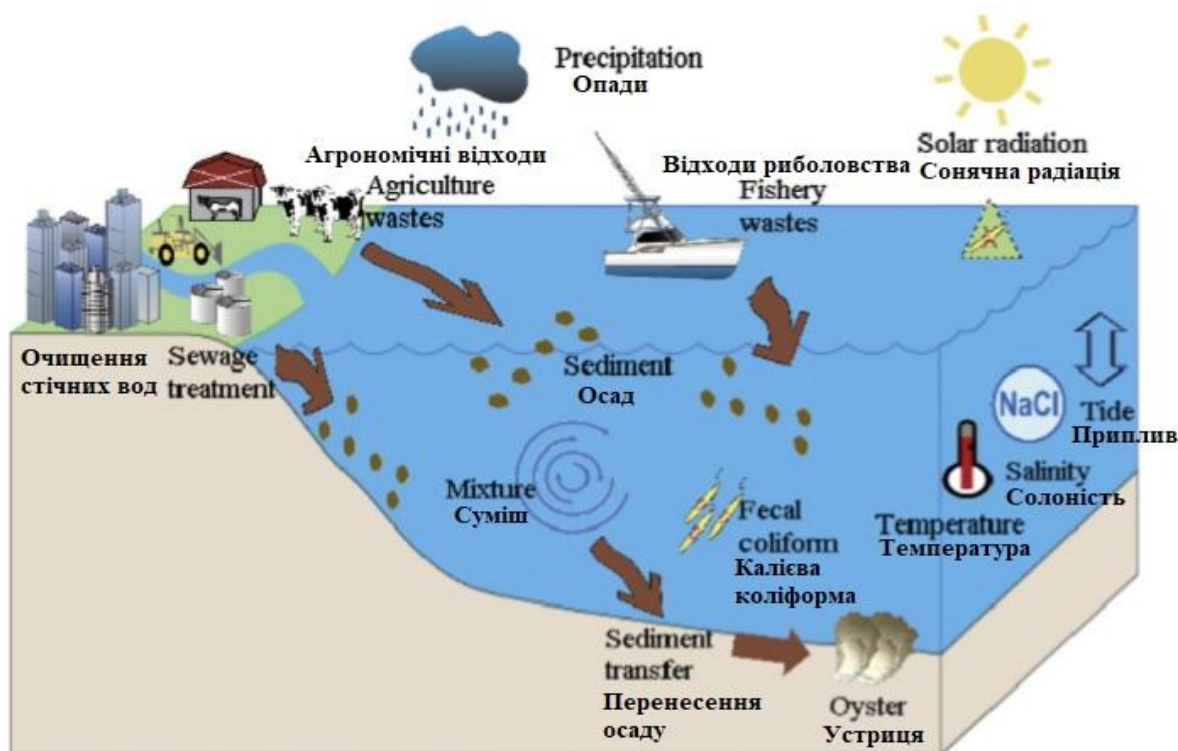


Рис. 1.5. Потенційні джерела, шляхи та вплив екологічних процесів на забруднення устриць у прибережних водах

Крім цього, верховими водами збудники захворювань змиваються з поверхні ґрунтів, контамінованих вірусами і бактеріями. Дощ тримає в облозі віруси з повітря. Потрапивши у воду, мікроорганізми зберігаються різний час, а деякі навіть розмножуються. Швидкість самоочищення залежить від біологічних особливостей збудника, хімічного складу і температури води, ступеня аерації, дії світла, сапрофітної флори та інших чинників.

Зміни клімату також провокують зміни гідрологічного стану територій, що позначається на формуванні нових ризиків виникнення і поширення інфекційних хвороб.

Поширеність зараження устриць Норовірусом в країнах ЄС

Згідно з дослідженням, більше третини зразків сирих устриць з виробничих районів Європи були позитивними на норовірус.

Дані, представлені European Food Safety Authority (EFSA), показали, що в районах виробництва устриць присутнє забруднення фекаліями людини. Дослідження виявило значну різницю у вмісті норовірусів (NoV) між виробничими площами порівняно з партіями відвантаження. Поширеність на виробничих площах оцінювалася в 34,5 відсотка, в той час як для партій з

диспетчерських центрів вона становила 10,8 відсотка.

За результатами досліджень вченого Марка Ертса "Представлені результати більш ніж однієї з трьох ймовірностей забруднення виробництва устриць ЕС на NoV, причому таке забруднення більш ніж в одній із 10 партій, відправлених для споживання людиною, підкреслює потенційну небезпеку NoV при виробництві устриць для споживання в якості живих двостулкових моллюсків", – йдеться в доповіді.

Двостулкові моллюски є джерелом норовірусної інфекції, так як вони накопичують і концентрують частинки NoV шляхом фільтрації води, забрудненої фекаліями. Ймовірність зараження зростає зі збільшенням дози, але залежить від особливостей організму, харчової матриці і факторів-господарів.

Відбір проб проводився в 12 державах-членах в період з листопада 2016 року по жовтень 2018 року, в 172 виробничих зонах і 207 диспетчерських центрах. Норвегія брала проби тільки з виробничих зон. В цілому 2180 дійсних зразків надійшли з виробничих зон і 2129-з диспетчерських центрів.

Кількісні рівні забруднення показали в середньому близько 337 копій на грам (срг) у зразках виробничої зони і приблизно вдвічі менше – 168 срг в партіях з диспетчерських центрів.

Половина позитивних партій (17,15% в пробах виробничих площ і 5,59% в партіях відвантаження) мали значення понад 200 срг, в той час як ті, хто перевищував 500 срг, становили 8,71% і 1,17% відповідно. Значення нижче 100 срг навряд чи викличуть спалахи, але існує підвищений ризик, коли рівні перевищують 500 срг.

"Такий ступінь забруднення може розглядатися як проблема громадського здоров'я, що підкреслює особливі ризики, пов'язані з цією системою виробництва харчових продуктів, підтримуючи необхідність активних стратегій управління ризиками для зниження ризиків у цьому харчовому ланцюжку на додаток до тих, які існують в даний час", - йдеться в дослідженні.

У ході дослідження був застосований метод ПЛР в реальному часі на основі ISO (15216–1:2017) для виявлення і кількісної оцінки NoV. Ця методологія потенційно може ампліфікувати РНК з життєздатних і нежиттєздатних вірусів.

Аналізи показали сильний сезонний ефект, з більш високим рівнем забруднення в листопаді-квітні, а також більш низьким рівнем забруднення для районів класу А в порівнянні з іншими класами.

В цілому 60 % проб з виробничих майданчиків були взяті з районів класу В, 39 % – з районів класу А і менше 1 % – з районів класу С. Устриці з районів класу А не вимагають післязбиральної обробки. Ті, хто належить до класу В, повинні пройти через очищення або ретрансляцію, перш ніж бути виставленими на ринок для безпосереднього споживання людиною в якості живих тварин. Було несподівано виявлено, що обумовленість пов'язана з більш низькими рівнями поширеності захворювання.

Отримані дані EFSA свідчать про те, що використання кишкової палички в якості узагальненого показника фекального забруднення в європейських правилах гігієни моллюсків дає корисну інформацію про ймовірність зараження NoV.

Існуючі два мікробіологічних критерії, що застосовуються до двостулкових моллюсків, що поставляються на ринок в якості живих харчових продуктів, можуть бути доповнені новим критерієм для операторів

диспетчерських центрів. Будь-який мікробіологічний критерій повинен бути врахованим в ланцюжку виробництва устриць, на якій він буде застосовуватися, і сезонні коливання впливу.

Норовірус є основною причиною спалахів гастроентериту в усьому світі. Дані зі Сполучених Штатів і європейських країн показали, що норовірус відповідальний приблизно за 50 % всіх зареєстрованих спалахів гастроентериту. Хоча спалахи норовірусу відбуваються протягом усього року, існує сезонна картина підвищеної активності норовірусу в зимові місяці, причому пік спалаху зазвичай припадає на Грудень в США і Квітень в Європі. Це сезонне явище спалахів устричного норовірусу можна пояснити кількома факторами, включаючи підвищену вологість, низькі температури, зниження сонячної інактивації, низьку солоність і сильні дощі. Норовірус важко виділити та ідентифікувати. Таким чином, фекальна кишкова паличка зазвичай використовується в якості ідеального індикаторного мікроорганізму.

Оскільки спалахи норовірусу залежать від факторів навколишнього середовища, для прогнозування спалахів устричного норовірусу можуть бути розроблені різні математичні моделі, що включають фактори навколишнього середовища в якості незалежних вхідних змінних. Зазвичай використовувані моделі включають байєсівські моделі, регресійні моделі, штучні нейронні мережі та моделі, засновані на процесах. Розуміння механізмів, відповідальних за спалахи норовірусу устриць, має важливе значення для розробки ефективних моделей, що зв'язують змінні середовища з норовірусом. Щоб вибрати правильну модель, необхідно враховувати точність моделі, можливості моделі, гнучкість моделі, вимоги до даних і простоту використання.

Ефективне виявлення та ефективне прогнозування спалахів норовірусу устриць вимагає комбінованого застосування інструментів моделювання та даних у режимі реального часу. Дані в реальному часі можуть бути отримані за допомогою різних методів, включаючи мультиплексну ПЛР, семінестровану ПЛР, ПЛР в реальному часі, кількісну ПЛР і дистанційне зондування супутників. Зростає інтерес до радіолокаційних супутників з активними датчиками, які можуть отримувати зображення без спотворень через атмосферні умови.

Методи, засновані на мікрочіпах ДНК, також можуть забезпечити можливість швидкого і великомасштабного аналізу вірусів. Необхідні додаткові зусилля в поєднанні з сенсорними моделями моніторингу / виявлення в реальному часі і прогнозування.

Отже, на сьогоднішній день норовірус займає друге місце в етіологічній структурі гострих кишкових інфекцій, але, на жаль, в Україні ця проблема тільки починає вивчатись, тому досліджень щодо вивчення розповсюдження норовірусної інфекції надзвичайно мало. Тому роль норовірусів у виникненні гострого гастроентериту потребує подальшого вивчення.