	<p><b>БЪЛГАРСКА АГЕНЦИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ</b></p> <p><b>НАЦИОНАЛЕН ДИАГНОСТИЧЕН НАУЧНОИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ИНСТИТУТ „ПРОФ.Д-Р Г.ПАВЛОВ”</b></p> <p>✉ Гр. София, 1606, бул. ”Пенчо Славейков” № 15 ☎ +359 (0) 2 952 12 77, 📠 +359 (0) 2 952 53 06 e- mail: ndrvmi-s@vetinst-bg.com</p>
---	--

**ШИФЪР: 4.34**

## **ЗАКЛЮЧИТЕЛЕН ОТЧЕТ**

на извършена научноизследователска разработка

по задача с шифър 4.34

**„МИКРОБИОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ДВУЧЕРУПЧЕСТИ  
МЕКОТЕЛИ”**

**СОФИЯ**

**2015 Г.**

## **СПИСЪК НА ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИЯ КОЛЕКТИВ:**

### **1. Водещ изпълнител на научната задача**

гл.ас.д-р Гергана Крумова-Вълчева

**Подпис:**.....

### **2. Съизпълнители**

гл.ас.д-р Ева Гюрова

**Подпис:**.....

## **ЕТАПИ И СРОКОВЕ НА ИЗПЪЛНЕНИЕ**

**Срок на изпълнение:** 01.01.2011 – 31.12.2015 г.

**Етапи на разработка:**

П1: 01.01.2011 г. – 30.06.2011 г.

П2: 01.07.2011 г. – 30.06.2015 г.

П3: 01.07.2015 г. – 31.12.2015 г.

## РЕФЕРАТ

На научна задача с шифър 4.34 „Микробиологични проучвания на двучерупчести мекотели”:

В периода 2011 г. до 2015 г. са извършени микробиологични проучвания върху проби живи двучерупчести мекотели, отглеждани в българските води на Черно море и диви мекотели с произход от североизточното крайбрежие на Средиземно море, внос от Турция.

Изследвани са общо:

- \* 87 проби живи молуски за установяване на патогенни *Vibrio spp.*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, определяне съдържанието (MPN/g) на коагулазоположителни стафилококи (*S. aureus*), *E. coli* (MPN/g) и общия брой на микроорганизмите в месо и вътречерупкова течност от живи миди, добити в различни мидени ферми чрез използване на стандартни методи.
- \* 94 бактериални изолата от живи миди, произхождащи от българските води на Черно море, за определяне видовия състав на бактериални изолати от живи миди, потвърдени със системата MICRONAUT-6.
- \* 43 изолата, потвърдени биохимично като *V. parahaemolyticus* за апробиране на конвенционална полимеразно-верижна реакция (PCR) за доказване на патогенни *Vibrio spp.*
- \* 47 проби живи миди за доказване на норовируси в живи двучерупчести мекотели.

От изследваните 87 проби живи миди, при 14 е установено наличие на *Vibrio spp.* Доминиращи видове в живите миди са *V. parahaemolyticus* (в 11 от изследваните проби), следвани от *V. alginolyticus* (в 3 проби) и *V. cholerae* и *V. mimicus* (по 1 проба). Само в 2 от пробите се доказва наличие на *Salmonella spp.* в 25 g, а в 3 от изследваните проби се доказва наличие на *Listeria spp.* (*L. monocytogenes* в 2 проби и *L. innocua* – в 1).

Най-високо съдържание (MPN/g) на коагулазоположителни стафилококи се регистрира в живи миди от Северното черноморие през топлия сезон – средна стойност  $9,2 \times 10^3$  MPN/g.

Данните от изпитванията показват, че най-вероятния брой на *E. coli* в месо и вътречерупкова течност от живи миди (MPN/100g) е значително по-висок през топлите месеци независимо от произхода на изследваните проби.

Средните стойности на ОБМ са най-високи през студените месеци в живите миди от Южното черноморие ( $4,7 \times 10^6$  CFU/g) и най-ниски за средиземноморски миди през същият период ( $5,5 \times 10^2$  CFU/g).

Процентът на неидентифицираните щамове със системата MICRONAUT-6 (MERCK) е значителен (50%). От идентифицираните видове най-голям дял заема *A. hydrophila* (12%), следван от *K. oxytoca* (8%) и *E. americana* (6%).

От проучените 43 щама *V. Parahaemolyticus*, присъствие на ToxR ген се установява само при 11 щама. В нито една от изследваните проби не се доказва наличие на гени, свързани с патогенността.

При изследването на 47 проби живи миди чрез полимеразно-верижна реакция в реално време (real-time TaqMan PCR, предхождан от стъпка на обратна транскрипция) спрямо норовируси от геногрупи I и II бяха установени 11 положителни находки за норовируси (23,4%).

## СЪДЪРЖАНИЕ

1.	ОСНОВНА ЧАСТ НА ОТЧЕТА	
1.1	УВОД.....	7
1.2	ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД.....	8
2.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	16
3.	СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ.....	18
3.1	МАТЕРИАЛ.....	18
3.2.	МЕТОДИ.....	19
3.3	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	26
4.	ИЗВОДИ.....	43
5.	ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	45

## 1. ОСНОВНА ЧАСТ НА ОТЧЕТА

### 1.1 УВОД

По данни на FAO през последните години се наблюдава непрекъснато увеличаване на световното производство на аквакултури, в частност и на синята мида (*Mytilus galloprovincialis*). Като основни производители в световен мащаб се сочат Китай, Испания и Италия. България, макар заемаща съвсем малък дял от световното производство, през последните години увеличи производството на култивирани миди и предлагането им на вътрешния и международни пазари.

Според официалният регистър на фермите за аквакултури към БАБХ през 2015 г. в България са регистрирани 15 мидени ферми в акваторията на Черно море. В тях са внедрени съвременни технологии за отглеждане на морски аквакултури. Основната част от произведените живи двучерупчести мекотели са обект на износ, а съвсем малка част се предлага на българския пазар.

Основният вид морски аквакултури, отглеждани в крайбрежните акватории на Черно море е черната морска мида (Black sea mussel).

Характерните физиологични особености на мидите като филтърно-хранещи се организми ги определят като важен фактор в развитието на хранителните заболявания при хората. Те поглъщат огромно количество морска вода. В резултат на това освен необходимите за живота им хранителни вещества, мидите акумулират различни токсични субстанции и микроорганизми, които се намират в морската вода. Известно е, че количеството на патогенните бактерии в морската среда обикновено е сравнително малко и безопасно за развитие на заболяване. Но мидите осигуряват идеални условия за размножаване и развитие на бактериите до рискови количества, ако след улова не се обработят своевременно и по този начин да контаминират продукта, така че той да стане рисков за консуматора.

Съществуват три основни групи биологични замърсители, които контаминират двучерупчестите мекотели. На първо място това са бактериите, които нормално обитават морската среда (представителите на сем. *Vibrionaceae* и *Listeria monocytogenes*). Те се смятат за естествени обитатели на моретата, тъй като живеят и се развиват добре при по-висока концентрация на натриев хлорид и при средна температура около 25<sup>0</sup>С. Втората група са бактерии, които имат отношение към безопасността на мидите и се отнасят към сем. *Enterobacteriaceae*, както и някои други условно патогенни микроорганизми, попадащи в мидите като резултат от човешката дейност. Към третата група се отнасят различни вируси (норовируси и хепатит А

вируса), които също се смятат за следствие от замърсяване на водната среда с фекални отпадъци.

По-голяма част от хранителните заболявания се срещат в страни, където традиционно мидите се консумират в сурово състояние или са подложени на недостатъчна термична обработка. Поради тази причина Европейската общност включи в своето законодателство по-строги мерки за допускането на живи двучерупчести мекотели на пазара. В действащото европейско законодателство районите за добив на двучерупчестите мекотели се класифицират съгласно изискванията в Приложение II на Регламент (ЕО) № 854/2004. Системата за класификация се базира върху степента на фекално замърсяване. В Регламент (ЕО) № 2073/2005 е определена норма от 230 MPN *E. coli* в 100 g месо и вътречерупкова течност в миди, предназначени за пазара.

На 20 септември 2001 г. Научният комитет по ветеринарни мерки, отнасящи се до здравето на хората (SCVPH) прие становище относно *Vibrio vulnificus* и *Vibrio parahaemolyticus*. Наличните в момента научни данни не изискват специфични критерии за патогенни вибриони в морски храни. Той обаче препоръчва да се съставят практически кодекси, за да се гарантира прилагането на добра хигиенна практика.

По-късно през 2002 г. заключи, че конвенционалните фекални индикатори са ненадеждни за доказване наличието или отсъствието на норовируси. Поради тази причина е необходимо внимателно отнасяне към пробите с високо съдържание на *E. coli* в тях и разглеждането им като опасни за здравето на хората.

Известната информация показва, че съществуват реални биологични опасности, свързани с консумацията на миди, които могат да доведат до потенциални неблагоприятни последици върху здравето на консуматора. Това налага системен и надежден мониторинг както върху бактериалните, така и върху вирусните замърсители в живите двучерупчести мекотели.

Като се има в предвид изложеното до тук, както и факта, че задълбочени проучвания относно микробиологичната контаминираност на живите двучерупчести мекотели у нас не са правени, считаме за актуално проучването на бактериалното и вирусно контаминиране на култивирани миди в Черно море.

## **1.2 ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД**

Поради непрекъснато намаляване на съществуващите запаси от диви миди и увеличаващото се търсене, се апробират съвременни методи за изкуствено развъждане. Във всички страни-производители на култивирани миди се разработват оптимизирани



схеми за екстензивно развъждане. Производственият цикъл на живи двучерупчести мекотели обхваща няколко етапа: добив на личинки, нарастване до определени размери, разреждане, отглеждане и улов с цел предлагане на пазара.

Най-съществената част от технологията за добив на двучерупчестите мекотели, е тяхното отглеждане. През седемдесете години на миналия век за първи път в България край Созопол (о-в Св. Иван) и нос Калиакра са разработени и внедрени техники за отглеждане на миди върху въжени конструкции. Основен източник са личинките от вида *M. galloprovincialis*, които обитават морското дъно и скалите в естествени условия или плуват свободно във водата. Личинките се прикрепват по дължина на въжените колектори във водния стълб, където нарастват за около 10-12 месеца. При необходимост се разреждат така, че броят им да не превишава 1000 на линеен метър, след което се спускат отново във водата за доотглеждане. Прибирането на живите миди се извършва ръчно или механизирано след достигане на определени търговски размери (6-9 cm). Събраните миди се прегледат, почистват и сортират по размер.

### **1.2.1. Оценка на микробиологичния риск, свързан с консумацията на двучерупчести мекотели**

#### *1.2.1.1. Бактериален риск*

Специфичният начин на хранене при двучерупчестите мекотели осигурява нормална функция на организма. Наред с това съществуват и благоприятни условия за задържане на микробни агенти (бактерии, вируси) и тяхното натрупване в моллюските (Stabili et al., 2005). Традиционното консумиране на полусурови моллюски в някои страни се определя като рисков фактор за възникване на хранителни заболявания.

Основните данни за хранителни отравяния, свързани с консумиране на моллюски са докладвани в 12 страни: 4 от тях са от Азия, 4 от Северна Америка и Австралия (Potasman et al., 2002). Най-често се съобщава за клинични прояви на заболявания след консумация на миди в САЩ. Над 45 % от известните случаи произхождат от САЩ (Rippey, S., 1994). Като основна причина се посочват представители на *Vibrio* spp.

Аквакултурите от двучерупчести мекотели се подлагат на системен контрол. Близостта им до брега създава възможност за обилно контаминиране с патогени, резултат от неправилно обработени отпадъци, системи за септично отлагане или замърсяване на акваториите от преминаващите кораби. Вторично замърсяване е възможно и по време на тяхната преработка от работния персонал (Richards et al., 2005).

Микрофлората на мидите е представена от две основни групи микроорганизми. Към първата група се отнасят бактерии с произход от морската среда. Такива са основно представители на сем. *Vibrionaceae* (от родовете *Aeromonas*, *Vibrio*, *Plesiomonas*), както и *Listeria monocytogenes*. Към втората група се включват хигиенно-показателни видове от сем. *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) и някои патогени (*Salmonella* spp. и *S. aureus*), които попадат във водата при замърсяване с фекални материи или от работниците при технологичната обработка на мидите (Pereira et al., 2006).

*Vibrio parahaemolyticus* е убиквитерен вид. Обитава предимно топлите географски акватории, но вече се открива и в по-хладните морета на Европа и Америка, като резултат от повишаване температурите на крайбрежните води в европейските водни басейни (Martinez-Urtaza et al., 2008).

По-голяма част от щамовете *V. parahaemolyticus* не са патогенни за хората. Патогенността на *Vibrio parahaemolyticus* се свързва с възможността му да произвежда два основни вида хемолизини, които атакуват директно еритроцитите (Sakurai et al., 1973). Това са термостабилен директен хемолизин (TDH) и термостабилен свързан хемолизин (TRH). Доказано е, че тези фактори на патогенност се срещат при 90 % от клиничните и до 1 % от теренните щамове (Kishishita et al., 1992).

Въпреки че *V. parahaemolyticus* е широко разпространен в морската среда, заболявания се наблюдават само след консумиране на морска храна. Инфекциозната доза е висока -  $10^4$  CFU (FDA, 2004).

Основният начин на заразяване е консумиране на сурови или не добре термично обработени мекотели. Мидите от сем. *Mytilidae* също се смятат като вектор за предаване на инфекцията при хората (Bauer et al., 2006).

При типизирането на *Vibrio parahaemolyticus* е важно да се установи и присъствие на определени специфични гени. Основните патогенни фактори са термостабилния директен хемолизин (TDH) и термостабилния свързан хемолизин (TRH). Възможността за продуциране на тези хемолизини се определя от наличие на специфични гени в генома, съответно *trh* и *tdh* гени, което налага разработване и въвеждане на PCR за тези гени в изолати от двучерупчестите мекотели.

*E.coli* се разпространява в околната среда с фекалиите на животните и хората, поради което наличието му във водата и храната се определя като основен индикатор за хигиената на производствения процес.

Замърсяването на морски храни с *E.coli* е установено отдавна, но циркулацията на патогенни щамове все още е слабо проучено. Съществуват оскъдни данни за

разпространение на *E.coli* в морски храни от Индия и САЩ (Kumar et al., 2001). Наличието на *E.coli* в тези храни се свързва най-често с вторично контаминиране на водната среда. Отвеждането на канални води в крайбрежните региони в близост до фермите за добив на двучерупчести, е основна причина за наличие на *E.coli* в крайния продукт. Замяряването може да настъпи и при използване на непитейна вода в центровете за експедиция или на рибните пазари. Това налага въвеждане на строги хигиенни мерки за контрола на *E.coli* в двучерупчести мекотели. Съгласно Регламент (ЕО) №2073/2005 на пазара се допускат живи двучерупчести мекотели, съдържащи, не повече от 230 MPN/100 g *E.coli* в месо и вътречерупкова течност.

Поради широкото разпространение и замърсяване на крайбрежните води, Европейската комисия въведе с Регламент № 853/2004 строги изисквания за класифициране на районите за добив на двучерупчести мекотели, въз основа съдържанието на *E.coli*. Контролират се всички етапи в производството и обработването на двучерупчестите мекотели.

Салмонелите са широко разпространение в целия свят. Откриват се както в топлокръвните, така и в студенокръвните животни. В клинично отношение се смятат за едни от най-честите инфекциозни причинители на стомашно-чревни заболявания при хората. Основен източник на инфекция са болните животни и хора, както и салмонелоносителите. Резервоар на салмонели са птиците и продуктите от птиче месо.

Проучванията върху заболяемостта от салмонелози в Европа и Северна Америка показват, че инфекциите със *Salmonella spp.*, свързани с консумирането на аквакултури и морски хидробионти са сравнително редки. Наличните данни за щамове *Salmonella*, изолирани в хора, се различават от тези, откривани в аквакултури. (Reilly & Twiddy, 1992). Potasman et al. (2002) обобщават данните за периода 1969-2000 г. и намират връзка между салмонелозите и консумирането на нерибни хидробионти. Авторите регистрират известна тенденция към повишаване на риска от възникване на хранителни салмонелози след консумация на рибни продукти и двучерупчести мекотели. Данните у нас са твърде ограничени, но и те свидетелстват за отсъствие на салмонелни бактерии в култивирани и в диви черноморски миди, но при силно фекално замърсяване (Михов и Златановар 1983).

Противоречива информация за наличието на *Salmonella spp.* в двучерупчестите мекотели изискват по-задълбочени микробиологични изследвания.

*L. monocytogenes* е естествен обитател на почвата и растенията. Освен това съществуват данни, за нормално присъствие в сладководните и морски води.

Разпространението ѝ в морската вода се свързва предимно със замърсяване от индустриални, човешки или животински отпадъци.

Открива се в почти всички сурови храни. Проведените през последните години проучвания показват, че *L. monocytogenes* е широко разпространена в риба, студено пушени рибни продукти и двучерупчести мекотели (Гюрова, 2009; Popovic et al., 2012; Yücel & Balci, 2010).

Двучерупчестите мекотели често са носители на *L. monocytogenes*. Поради традиционния обичай за консумация на мидите (сурови или полусурови) се увеличава значително и степента на епидемиологичен риск.

През последните години различни автори публикуват съобщения, относно разпространението на *L. monocytogenes* в миди. Проучване на Memoci&Sulaj (2010) в периода 2008-2009 г. показва присъствие на *L. monocytogenes* в 6,1 % от изследваните проби миди от вида *M. galloprovincialis*. През 2009 г. Roldan et al. (2011) също доказват *L. monocytogenes* в средиземноморски миди.

В храните *S. aureus* попада обикновено вторично при преработката на храната. В двучерупчестите мекотели и продуктите, произведени от тях, *S. aureus* не се изолира често. Контаминирането се реализира по време на обработката след улова им. Наличието на *S. aureus* в мидите създава потенциален риск за контаминиране. При неспазване на хигиенните условия и температурния режим за съхранение е възможно бързо размножаване на стафилококите и продуциране на ентеротоксин.

В литературата съществуват многобройни данни за стафилококови хранителни заболявания Докладвани са и 4 хранителни отравяния, причинени от морски храни (Tood, 1997), както и 5 стафилококови интоксикации, свързани с консумиране на контаминирани миди (Rippey, 1994).

В Регламент (ЕО) № 2073/2005 за микробиологичните критерии в храните е включен показател за *S. aureus* при хигиенния контрол в производството на почистени от черупките ракообразни и мекотели. Въведените регулации допускат наличие на *S. aureus* от 100 до 1000 cfu/g при анализ на 5 единици (n=5, c=2).

Yilmaz et al. (2005) намират в проби *M. galloprovincialis* съдържание на *S. aureus* до  $3,1 \times 10^2$  cfu/g. Авторите откриват връзка между общия брой микроорганизми, *E. coli* и наличието на *S. aureus* в съответните проби.

Направеният литературен преглед потвърждава мнението, че *S. aureus* е патоген с определен потенциален риск за човешкото здраве. Присъствието му в двучерупчести мекотели и в производствените предприятия е сигнал, който не бива да се пренебрегва.

### 1.2.1.2. Вирусологичен риск

През 2011 г. Европейският орган за безопасност на храните (EFSA) (чрез панела BIOHAZ) излезе със становище относно вирусите в храните (2011). Извършен беше преглед на съществуващата научна информация за биологията, епидемиологията, диагностиката и рискът за обществото от вируси в храните.

Контаминирането на двучерупчестите мекотели с човешки патогенни вируси се осъществява чрез фекално замърсяване в производствените акватории. Особено внимание се обръща на вирусите от сем. *Caliciviridae* - норовируси и саповируси и хепатит-А вируса (сем. *Picornaviridae*).

Норовирусна инфекция при хората е описана за първи път през 1929 г. като т.нар. „зимна болест на повръщането”. През 1972 г. вирусът е визуализиран с помощта на електронен микроскоп ((Scipioni et al., 2008) при ретроспективно проучване на епидемичен взрив от гастроентерити, избухнал през 1968 г. в гр. Norwalk. Причинителят е наречен по-късно Norwalk-like вирус, а наименованието норовируси е дадено от Международния комитет по таксономия на вирусите.

Норовирусите се отнасят към р. *Norovirus* на сем. *Caliciviridae*. Те са разделени в 5 геногрупи (от GI до GV). Най-чести причинители на заболявания при човека са щамове от геногрупа GII. Освен тях човешки норовируси са включени още в геногрупи GI и GIV.

Норовирусите инфектират човека при поглъщане през устата и се размножават в епитела на чревния канал. Отделят се чрез изпражненията, като така контаминират човека. Вирусите запазват своята жизнеспособност продължително време в сладки и солени води.

Единствените ефективни методи за вирусна деконтаминация на двучерупчестите мекотели е обработката им с висока температура. Hewit and Greening (2006) изследват влиянието на термичното въздействие върху норовирусите в новозеландски миди и стигат до извода, че обработката с пара за 5 min води до повишаване на температурата във вътрешността им до 90<sup>0</sup>C, което се приема като достатъчно ефективно за инактивиране на вируса. При обработка на мидите в кипяща вода температурата във вътрешността им достига 90<sup>0</sup>C за около 2,5 min. Задържането при тази температура за около 4 min води до унищожаване на вирусите.

Ефективна норовирусна инфекция се развива след поглъщане на 10 до 100 вирусни частици. Първите признаци на заболяване се появяват от 24 до 72 часа след поглъщане на причинителя. Основните симптоми са повръщане, диария и коремни

болки. В повечето случаи признаците са бързопреходни с последващо оздравяване за няколко дни. Понякога може да се развият прояви на лека настинка, главоболие, треска и мускулни болки. При малки деца и възрастни лица заболяването може да протече по-тежко.

Източник на човешки норовируси в околната среда са човешките фекалии, чрез които се контаминират почвата и водните източници. Фекалното замърсяване от отпадните води достига местата за отглеждане на двучерупчести мекотели. Чревните вируси се прикрепват към планктона във водата и след 4-5 часова акумулация в контаминираната вода, нивото на вируса в моллюските може да превиши 1000 частици.

Съществуват множество съобщения за хранителни заболявания, причинени от норовируси. Днес те се считат за лидер-причинител на епидемични взривове от небактериални остри гастроентерити сред всички възрастни групи в световен мащаб. През 2006 г. в Европа са докладвани случаи на норовирусни гастроентерити в 14 страни-членки. Прави впечатление, че броят на епидемичните взривове се увеличава в сравнение с 2004 г. и 2005 г. (Kroneman et al., 2006).

През последните години се апробират съвременни генетични техники за изучаване на норовирусите. Основен проблем за молекулярната диагностика е голямата генетична и антигенна разновидност на норовирусите.

Основният метод за детекция на норовирусите е RT-PCR real-time формат. Чрез него се откриват човешки норовируси със специално проектирани праймери и сонди. Същността на техниката първоначална стъпка за обратна транскрипция, с което се постига превръщане на вирусната РНК в копирана ДНК, последвана от циклична амплификация (намножаване) на специфичен участък от норовирусният геном. Методът е високо чувствителен, но все пак следва да се отчете и факта, че в изследваните проби се съдържат и голямо количество инхибитори, които не рядко водят до фалшиво отрицателни резултати.

Понастоящем RT-PCR се възприема като „златен стандарт“ в диагностиката на норовирусите. В практиката се използва основно разновидността на метода TaqMan RT-PCR. Вариантът на TaqMan RT-PCR може да се прилага както за качествено доказване, така и за количествено определяне на норовирусите, когато са налични съответни стандарти. Използват се маркирани сонди, които повишават специфичността и чувствителността на реакцията, като стъпките на обратна транскрипция и PCR амплификация се извършват в една епруветка (едностъпков Real-Time PCR). Предимството е, че се изключва от употреба канцерогенния етидиев бромид.

В двучерупчестите мекотели норовирусите се откриват често, но в малки количества. След проведени мониторингови програми от EFSA се съобщава за наличие на норовируси в миди до 60% от изследваните проби (EFSA, 2011).

Vilarino et al. (2009) проучват разпространението на норовируси, едновременно в диви и култивирани миди и установяват присъствие на геногрупа GI в 53,7 % от пробите, а GI – само в 7,3 %. Прави впечатление че норовирусите се срещат по-често в дивите, отколкото в култивираните миди.

Yilmaz et al. (2010) също доказват по-често присъствие на норовирус геногрупа GI (4,5 % от пробите). В нито една проба авторите не откриват GI.

Двучерупчестите мекотели се отглеждат в близост до бреговете, където хранителните запаси са високи. За съжаление много често тези региони са и контаминирани със замърсени отпадни води. В процеса на филтърното хранене, моллюските концентрират и задържат редица човешки патогени. Рискът от биоакумулация на опасни микроорганизми се свързва с традиционното консумиране на сурови или недостатъчно топлинно обработени миди. Друг важен фактор е, че мидените ядки се консумират с храносмилателния канал, където са натрупани в голямо количество различни патогени.

Посочените обстоятелства са много съществени от гледна точка на епидемичния риск, поради което двучерупчестите мекотели са обект на системен микробиологичен контрол.

В Регламент (ЕО) №2073/2005 не са включени критерии за вирусите в двучерупчестите мекотели, но се препоръчва приемане на практически кодекси за добри хигиенни практики с цел ограничаване разпространението на патогенни *V. vulnificus* и *V. parahaemolyticus* в мидите.

През 2002 г. SCVPH излезе със специално становище относно норовирусите. В него се прави заключение, че конвенционалните фекални индикатори не са надеждни за доказване наличие или отсъствие на норовируси. Елиминирането на фекалните бактериални индикатори за определяне степента на пречистване на черупчестите е опасна практика. Направени са препоръки за използване на *E.coli* като критерий за фекално замърсяване в зоните за събиране на мидите.

Поради отсъствие на стандартизирани методи за детекция на вируси в храните е необходимо да се предприемат адекватни мерки за разработване и внедряване на подходящи лабораторни техники. Контролът върху наличието на вируси в живи

двучерупчести мекотели ще доведе до намаляване на риска за общественото здраве по отношение на тези патогени.

Проучването на литературните данни от края на миналия век до днес показва, че съществуват много неизяснени въпроси, относно епидемиологията на хранителните заболявания от двучерупчести мекотели. Проведени са ограничени микробиологични изпитвания върху патогени от родовете *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* и *Escherichia*. През последните десетилетия са наблюдава разширяване обхвата на рисковите микроорганизми. Извършени са комплексни научни изследвания и на естествената микрофлора на морската среда, включително видовете от родовете *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, както и на някои вируси.

С непрекъснатата динамика в морските води, се наблюдават и промени в микробиологичните показатели на мидите. Това налага извършване на периодичен мониторинг, особено през активния топъл сезон. Тогава се регистрира и повишено фекално замърсяване на крайбрежните акватории в близост до курортите в съчетание с повишена консумация на морски храни.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Целта на настоящото проучване е да се установи микробиологичния статус на живи култивирани миди (*Mytillus galloprovincialis*), отглеждани в българската акватория на Черно море и живи диви миди (*Tapes decussatus*), улов от Североизточното крайбрежие на Средиземно море.

За изпълнение на целта, си поставихме следните конкретни задачи:

2.1. Да установим наличие на патогенни *Vibrio spp.* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

2.2. Да докажем *Salmonella spp.* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

2.3. Да установим присъствието на *L. monocytogenes* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

2.4. Да определим съдържанието (MPN/g) на коагулазоположителни стафилококи (*S. aureus*) в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

2.5. Да установим съдържанието на *E. coli* (MPN/g) в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

2.6. Да определим общия брой на микроорганизмите в месо и вътречерупкова течност от живи миди, добити в различни мидени ферми.



2.7. Да изследваме видовия състав и основните фенотипни свойства на бактериални изолати от живи миди.

2.8. Да апробираме конвенционална полимеразно-верижна реакция (PCR) за доказване на патогенни *Vibrio spp.*

2.9. Да установим разпространението на норовируси в живи миди.

2.10. Да апробираме Real-Time TaqMan PCR за доказване на норовируси в живи миди.

### 3. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

#### 3.1. МАТЕРИАЛ

3.1.1. Установяване наличие на патогенни *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.* и *L. monocytogenes* и за определяне съдържанието (MPN/g) на коагулазоположителни стафилококи (*S. aureus*), *E. coli* (MPN/g) и общия брой на микроорганизмите в месо и вътречерупкова течност от живи миди, добити в различни мидени ферми

Изследванията са проведени върху 87 проби живи миди. От тях 41 са култивирани миди *Mytilus galloprovincialis*, отглеждани в българските води на Черно море и 46 са диви миди от вида *Tapes decussatus*, с произход североизточното крайбрежие на Средиземно море.

Всяка проба се състои от пул, съдържащ не по-малко от 10 отделни живи миди.

Пробите са транспортирани в термоизолирани контейнери при 4<sup>0</sup>C. Микробиологичните изпитвания са проведени до 24 h след постъпване в лабораторията.

Проучванията обхващат условно два годишни сезона – топъл (от м.май до м.септември) и студен (от м.октомври до м. април).

3.1.2. Определяне видовия състав на бактериални изолати от живи миди.

Обект на изследване са 94 бактериални изолата от живи миди, произхождащи от българските води на Черно море

3.1.3. Аprobиране на конвенционална полимеразно-верижна реакция (PCR) за доказване на патогенни *Vibrio spp.*

Изследвани са 43 изолата, потвърдени биохимично като *V. parahaemolyticus*. Проверено е наличието на общ за *V. parahaemolyticus* *Tox-R* ген, термостабилен директен хемолизин ген (*tdh*) и термостабилен свързан хемолизин ген (*trh*).

3.1.4. Молекулярно-биологични методи за доказване на норовируси в живи двучерупчести мекотели

Изследванията са проведени върху 47 проби живи миди. От тях 15 са култивирани миди *Mytilus galloprovincialis*, отглеждани в българските води на Черно море и 32 са диви миди от вида *Tapes decussatus*, с произход североизточното крайбрежие на Средиземно море.

Всяка проба се състои от пул, съдържащ не по-малко от 10 отделни хепатопанкреаса от живи миди.

Пробите са транспортирани при 4<sup>0</sup>C.

Съхранявани са на -24°C до провеждане на молекулярните анализи.

## 3.2. МЕТОДИ

### 3.2.1. Подготовка на пробите

Пробите са подготвяни за изпитване съгласно изискванията в ISO 6887-3 (2003).

Мидите са отваряни със стерилни инструменти. Месото и вътречерупковата течност са поставяни в стерилна петриева паничка. Взетият материал от всяка проба е хомогенизиран с помощта на перисталтичен хомогенизатор (стомахер).

3.2.2. Установяване на *Vibrio spp.* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

Изследването е проведено в съответствие с ISO/TS 21872-1 (2007). При растеж на съмнителни колонии за *Vibrio spp.*, същите са препосявани върху солена агар и изпитвани по микроскопски и фенотипни показатели. За биохимично потвърждаване са използвани готови търговски китове API 20E.

Освен с API 20E изолатите са изпитвани за подвижност, оксидаза и халотолерантност.

3.2.3. Доказване на *Salmonella spp.* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

Присъствието на *Salmonella spp.* в 25 g от изследваните проби е определяно по хоризонталния метод за доказване на *Salmonella spp.* в храни и фуражи – БДС EN ISO 6579 (2003).

При изолиране на съмнителни колонии от твърдите селективни хранителни среди (XLD и ФРА), същите са диференцирани до вид със съдействието на НРЛ «Салмонела, кампилобактер и антиминокробна резистентност» към НДНИВМИ-София.

3.2.4. Установяване на *Listeria monocytogenes* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

За откриване на *L. monocytogenes* в 25 g е използван метода, описан в БДС EN ISO 11290-1 (2005).

Потвърждаването на съмнителните изолати е извършено въз основа на биохимични и серологични показатели със съдействието на НРЛ „Листерия и Е. коли”.

3.2.5. Определяне на съдържанието (MPN/g) на коагулазоположителни стафилококи (*S. aureus*)

Съдържанието на коагулазоположителни стафилококи (*S. aureus*) е определяно, съгласно изискванията на хоризонталния метод в EN ISO 6888-3 (2003). Посевките са извършвани в три епруветки от 3 последователни разреждания на материала.

При растеж на съмнителни колонии за *S. aureus* върху средата на Baird-Parker е извършено потвърждаване с тестовете за плазмокоагулаза, хемолиза, каталаза и протеин А.

Изчислението на най-вероятния брой е направено в съответствие с БДС EN ISO 7218 (2007).

#### 3.2.5.1 Определяне наличие на протеин А

За теста е приготвяна 24 h-ова култура върху кръвен агар. За изпитването са използвани два реагента - R1 и R2. Смесването на изпитваната култура с капки от реагентите е провеждано върху специални плаки. След внимателно разклащане на плаките в продължение на 20 sec е отчитана появата на аглутинация с реагента R1.

Изследването е извършвано паралелно с контролен щам на *S. aureus*.

**3.2.6. Определяне на съдържанието на *E.coli* (MPN/g) в месо и вътречерупкова течност от живи миди.**

В изпитванията е прилаган стандарт ISO/TS 16649-3 (2003), в т.ч. и частта за изследване на три последователни разреждания в 5 епруветки.

При растеж на съмнителни колонии изчисленията за определяне на най-вероятния брой в 100 g месо и вътречерупкова течност от живи миди е извършвано, съгласно процедурите в БДС EN ISO 7218 (2007).

**3.2.7. Определяне общия брой на микроорганизмите (ОБМ) в месо и вътречерупкова течност от живи миди**

Определянето на общия брой микроорганизми при 30<sup>0</sup>C е извършено според изискванията на БДС EN ISO 4833 (2004).

След култивиране при 30<sup>0</sup>C за 72 h се изброяват coloniите в две последователни разреждания, където броят на coloniите във всяка петра е най-малко 10 и не повече от 300. Изброяването на coloniите е извършено с апарат Colony Counter (iUL, Instruments).

Общият брой на микроорганизмите е изчислен по формулата:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

където:

- $\Sigma C$  - Сумата от колонии, преброени в две петри, получени от две последователни разреждания, в едно от които са налични най-малко 10 колонии
- V - Обемът на инокулата във всяка петра, в ml
- d - Разреждането, съответстващо на първото разреждане (d=1 при анализ на неразтворим течен продукт (тестовата проба))

### 3.2.8. Определяне видовия състав на бактериални изолати от живи миди.

За биохимично потвърждаване на изолатите е използвана системата MICRONAUT-6 (MERILIN Diagnostica, Germany) със следните търговски китове:

3.2.8.1. MICRONAUT-NF – за диференциране на Грам-отрицателни, оксидазо положителни бактерии

3.2.8.2. MICRONAUT-E –за диференциране на Грам-отрицателни, оксидазо отрицателни бактерии

3.2.8.3. MICRONAUT-RPO –за диференциране на аеробни Грам положителни бактерии.

3.2.8.4. MICRONAUT-IDS – за диференциране на Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии

3.2.9. Апробиране на конвенционална полимеразно-верижна реакция (PCR) за доказване на патогенни *Vibrio spp.*

#### 3.2.9.1 Консумативи

3.2.9.1.1. Мастермикс за протичане на реакцията (LKB)– 50  $\mu$ l реакционен обем:

- реакционен буфер,
- 5  $\mu$ l магнезиев хлорид (25 mM)
- 0,625  $\mu$ l dNTPs (20 mM),
- 0,5  $\mu$ l Forward praimer,
- 0.5  $\mu$ l Reverse praimer,
- 30,625  $\mu$ l стерилна двойно-дестилирана вода,
- 0,25  $\mu$ l TaqPol (5 U/ $\mu$ l)

3.2.9.1.2. Агарозен гел (2 %) (SeaKem Agarose)

3.2.9.1.3. 1ХТАЕ-буфер

- Tris (0,04 M)
- Acetic acid (0,02 M)

- Na<sub>2</sub>EDTA (0,002 M)

3.2.9.1.4. Етидиев бромид

3.2.9.1.5. Маркер за 100 bp - GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas).

### 3.2.9.2. Праймери

Нуклеотидната последователност е определяна с 3 двойки праймери, специфични за тестваните гени. В биохимично потвърдените щамове е изследвано наличието на общ за *V. parahaemolyticus* *ToxR* ген и гените, определящи патогенността – *tdh* и *trh*.

### 3.2.9.3. Референтни щамове

За потвърждаване наличието на съответните гени е използвана ДНК от *V. parahaemolyticus* EURL V05/14

### 3.2.9.4. Методология

3.2.9.4.1. Изолиране на бактериална ДНК

За изолиране на бактериалната ДНК е прилаган Протокол на Европейската референтна лаборатория за бактериални и вирусни контаминанти в двучерупчести мекотели (CEFAS, Weymouth).

3.2.9.4.2. Амплификация

PCR амплификацията е оптимизирана в 50 µl реакционен обем, включващ 47,5 µl мастермикс и 2,5 µl от изолираната ДНК.

Полимеразната верижна реакция е проведена в термоциклер Techne TC 412 (Techne). Процедурите на изпитване са съобразени с температурните режими, представени на таблици 1 и 2.

**Таблица 1. Температурни режими на PCR за откриване на *ToxR***

Вид на процеса	Цикли (брой)	Температура (°C)	Време (min)
Първоначална денатурация	1	96	5
Денатуриране	20	94	5
Удължаване на праймерите		63	1,5
Разделяне на получения амплификат		72	1,5
Финално удължаване	1	72	7

**Таблица 2. Температурни режими на PCR за откриване на *tdh* и *trh* гени**

Вид на процеса	Цикъл (брой)	Температура (°C)	Време (min)
Първоначална денатурация	1	94	3
Денатуриране	30	94	1
Удължаване на праймерите		58	1
Разделяне на получения амплификат		72	1
Финално удължаване	1	72	5

#### 3.2.9.4.3. Електрофореза

Амплифицираните ДНК фрагменти са доказани след хоризонтална електрофореза на 2 %-ов агарозен гел (SeaKem Agarose) в 1ХТАЕ-буфер, приготвени съгласно тт. 3.2.8.1.2 и 3.2.8.1.3, при 130 V до достигане на противоположния полюс на гела.

Оцветяването на гела е проведено в разтвор на етидиев бромид в продължение на 20 min.

Резултатите са визуализирани с UV светлина ( $>2500 \mu\text{W}/\text{cm}^3$ ).

Като маркер за 100 bp с цел определяне на молекулното тегло е използван GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas).

**3.2.10. Молекулярно-биологични методи за доказване на норовируси в живи двучерупчести мекотели**

#### 3.2.10.1. Консумативи

3.2.10.1.1. Протеиназа К - 20 mg/ml, (Invitrogen, LifeTechnology).

3.2.10.1.2. Кит за екстракция на вирусна нуклеинова киселина - PureLink Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen, Life Technology)

3.2.10.1.3. Реакционен микс за протичане на обратна транскрипция:

- 11,0  $\mu\text{l}$  RNA-se free water
- 7,0  $\mu\text{l}$  Buffer II (10X) (Invitrogen, Life Technology)
- 7,0  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM)
- 1,0  $\mu\text{l}$  Random Hexamer
- 2,0  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM)
- 2,0  $\mu\text{l}$  Reverse transcriptase (200 U/ml) (Invitrogene, Life Tehnology)

3.2.10.1.4. Мастермикс за протичане на Real-Time TaqMan PCR в отделни реакции за норовируси геногрупа I и II

- 12,5 µl 2XMM (Universal TaqMan Master Mix, Applied Biosystems, USA)
- 5,0 µl RNA-se free water
- 1,0 µl Primer Forward (500 nM)
- 1,0 µl Primer Reverse (500 nM)
- 0,5 µl Probe

#### 3.2.10.2. Избор на олигонуклеотидни последователности

Едновременната детекция и геногрупова идентификация на норовирусите бяха осъществявани с 2 двойки праймери, насочени към високо-консервативен участък от гена, кодиращ РНК-зависимата РНК-полимераза на норовирусите геногрупи GI и GII.

#### 3.2.10.3. Референтни материали

Като положителни контроли за етапите на екстракция на вирусната НК и амплификационната реакция са използвани следните човешки норовирусни щамове, чиято геногрупова и генотипова идентификация е потвърдена чрез секвенционни техники:

- За геногрупа GI – *Norovirus/Hu/GI.4/BG629/2009/BUL*
- За геногрупа GII – *Norovirus/Hu/GII- 2006b/BG752/2009/BUL*

#### 3.2.10.4. Методи

##### 3.2.10.4.1. Подготовка на пробите

За изпитването са подбрани от всяка проба по 10 живи миди с неповредени черупки. След почистване и измиване, мидите са отваряни със стерилни инструменти като храносмилателните жлези (хепатопанкреаса) са отделяни в стерилни петриеви панички. След внимателно нарязване е проведено хомогенизиране на пуловете, образувани от 10 хепатопанкреаса.

##### 3.2.10.4.2. Първична обработка на материала от миди

От хомогенизирания материал са претегляни по 2 g в центрофужни епруветки, след което са добавяни по 2 ml протеиназа К.

Инкубирането е проведено при 37<sup>0</sup>C за 60 min в термошейкър. Следва хомогенизиране на вортекс и центрофугиране при 1000 xg за 1 min. Супернатантата е отделена и отново инкубиране на водна баня при 65<sup>0</sup>C за 15 min. Последва ново хомогенизиране и центрофугиране при 3000 xg за 3 min.



Получената супернатанта е изпитвана за наличие на норовируси.

#### 3.2.10.4.3. Екстракция на норовирусна РНК

За изолирането на вирусната РНК е използвана 300 µl от супернатанта, получена в съответствие с т. 3.2.9.4.2. Екстракцията е извършена с търговски кит PureLink Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen, LifeTechnology), съгласно инструкциите на фирмата-производител.

#### 3.2.10.4.4. Първична денатурация

Първичната денатурация на екстрахираната РНК (еРНК) е проведена при 95<sup>0</sup>С за 5 min, с последващо охлаждане за 3 min.

#### 3.2.10.4.5. Обратна транскрипция

Условията за обратната транскрипция са съобразени с протокол на EuroRotaNet за РНК-ови вирусил

Към 30 µl общ обем от мастермикса е добавяна 40 µl от еРНК. Процесът на обратна транскрипция е проведен на водна баня на 37<sup>0</sup>С за 60 min. След края на реакцията е получено пълно копие ДНК (кДНК) на екстрахираната РНК.

#### 3.2.10.4.6. Real-Time TaqMan PCR, UniPCRMM

Процедурата на Real-Time PCR е реализирана в 25 µl реакционен обем. След приготвяне на реакционния обем с добавяне на съответните праймери и сонди за геногрупи GI и GII, кДНК от всяка проба е дозирана в количество 5 µl.

Амплификацията е проведена при следните температурни режими (табл. 3).

**Таблица 3. Температурни режими за Real-Time TaqMan PCR**

цикъл	Температура (°C)	Време (min)
Hot Start	95	10
50	95	15 sec
	60	1
	65	1
Hold	4	

За поддържане на условията на PCR реакцията е използван апарат Opticon 2 (MJ Research, BioRad) при НЦЗПБ – София. Положителните резултати са визуализирани след 25 цикъл.

### 3.3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

#### 3.3.1. Установяване на *Vibrio spp.* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

От изследваните 87 проби живи миди, при 14 е установено наличие на *Vibrio spp.* Шест от тях произхождат от северното Черноморие, 3 – от южното и 5 от Средиземно море. При разпространението на *Vibrio spp.* в живи миди се регистрира определена сезонност (табл. 4). Девет от положителните проби са доказани през топлия и 5 – през студения сезон.

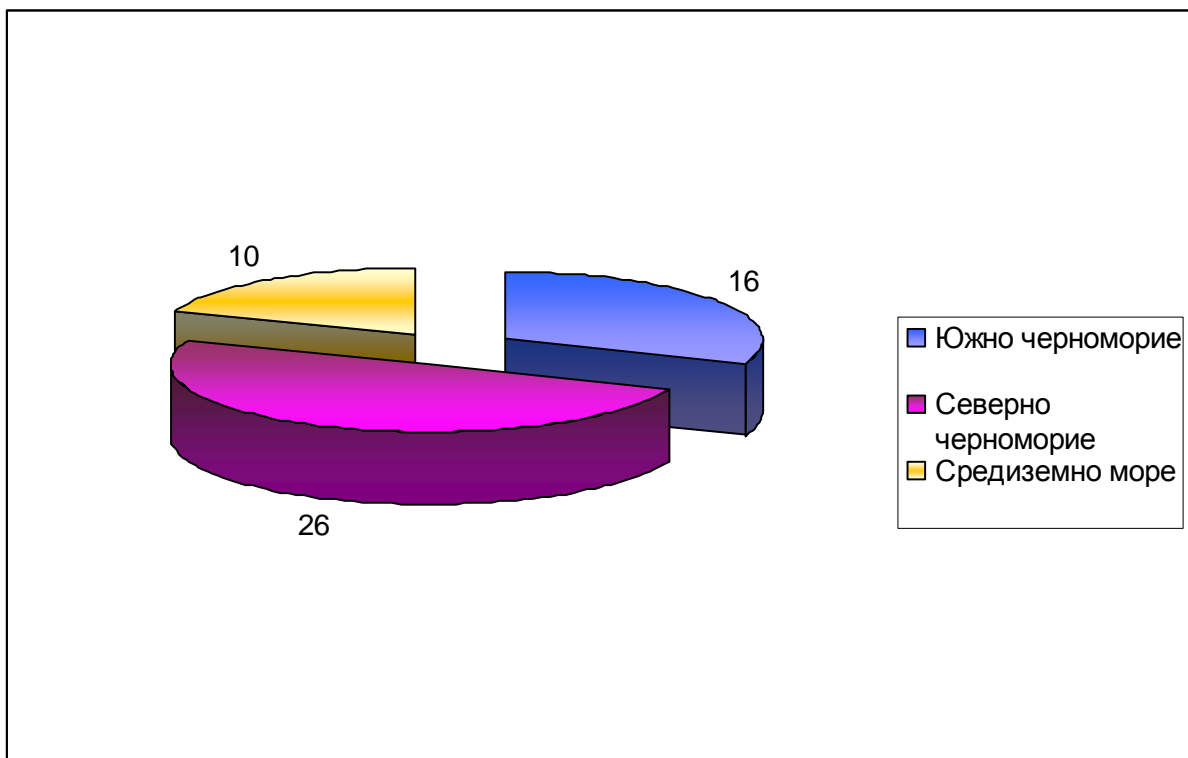
Таблица 4. Сезонно разпространение на *Vibrio spp.* в живи миди от българското черноморие и Североизточното крайбрежие на Средиземно море.

Местонахождение	Топъл сезон		Студен сезон	
	Общ брой изследвани проби	Положителни проби	Общ брой изследвани проби	Положителни проби
Южно черноморие	5	2	13	1
Северно черноморие	15	6	8	0
Средиземно море	4	1	42	4

Подобна тенденция е установена при изследванията на други автори. В 3-годишни проучвания Miller et al. (2006) съобщават за присъствие на *Vibrio spp.* в 46 проби от различни видове миди, анализирани през два сезона – сух (юли-ноември) и влажен (декември-май). Доказано е, че в 48 % от изследваните проби през сухия период и 26 % през влажния период, са положителни за *Vibrio spp.*

Макар и оскъдни все пак съществуват данни за разпространение на нехолерни вибриони в български миди. Нашите изследвания потвърждават установеното от Михов и Златанова (1983) наличие на вибриони в единични проби миди през летните месеци и отсъствие през студения сезон.

Географското разпределение на *Vibrio spp.* в живи миди е представено на фиг. 1. От изложеното е видно, че вибриони се откриват предимно в живи миди от Северното черноморие и сравнително по-рядко в миди от Средиземно море и Южното черноморие.

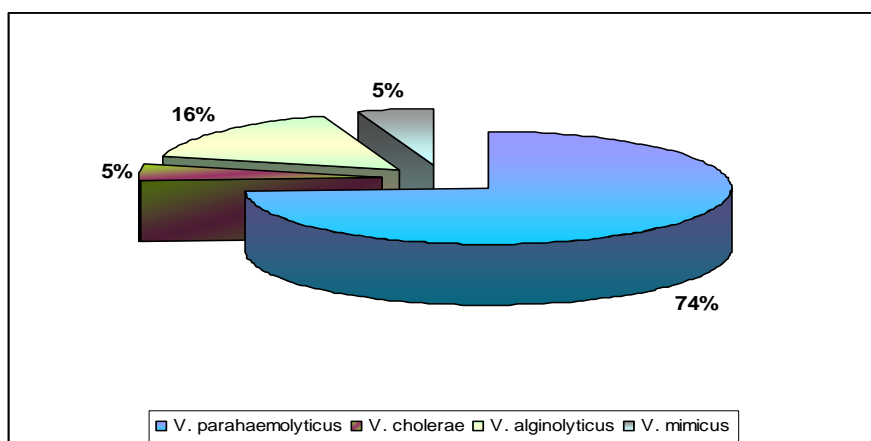


**Фигура 1. Географско разпространение на изолираните *Vibrio spp.* в живи миди.**

Данните от изследванията на 132 изолата *Vibrio spp.* по показателите отнасяне по Грам, подвижност, оксидаза и халотолерантност, както и биохимичната им характеристика с API 20E показват, че 39 изолата се отнасят към *V. parahaemolyticus*, по 1 щам - *V. mimicus* и *V. cholerae*, 3 - *V. alginolyticus*. Осемдесет и осем от щамовете не са определени до вид, отнасящ се към р. *Vibrio*.

Всички щамове, определени като *Vibrio spp.* са Грам-отрицателни, оксидазо-положителни, подвижни при 37<sup>0</sup>C и халотолерантни в среда с 2% NaCl.

Доминиращи видове в живите миди са *V. parahaemolyticus* (74 %), следвани от *V. alginolyticus* (16 %) и *V. cholerae* и *V. mimicus* (по 5%) (фиг. 2).



**Фигура 2. Разпределение на изолираните видове от род *Vibrio*.**

Получените данни са в съгласие с резултатите на Hervio-Heath et al. (2002) за разпространението на р. *Vibrio*. Авторите съобщават за по-често изолиране на *V. alginolyticus* (60 %), следван от *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* и *V. mimicus*. Част от изолатите не се идентифицират като вид, отнасящ се до групата на вибрионите.

При сравняване на нашите данни за видовия състав на р. *Vibrio* в мидите с тези на други изследователи се откриват и известни различия. Т.напр. Yücel and Balci (2010) намират в мидите висок процент *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fluvialis*, *V. damsela* и др.

### 3.3.2. Доказване на *Salmonella spp.* в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

Резултатите от извършените изследвания са представени на табл.5.

**Таблица 5. Наличие на *Salmonella spp.* в живи миди от българското черноморие и Средиземно море в зависимост от сезона.**

Местонахождение	Топъл сезон		Студен сезон	
	Общ брой изследвани проби	Положителни проби	Общ брой изследвани проби	Положителни проби
Южно черноморие	5	1	13	0
Северно черноморие	15	1	8	0
Средиземно море	4	0	42	0

От изложените данни се вижда, че от 87 изследвани проби живи миди, само в 2 се доказва наличие на *Salmonella spp.* в 25 g. Необходимо е да се посочи, че този патоген се открива в единични проби, произхождащи от Южното и Северното

черноморие и в нито една от пробите средиземноморски миди. Присъствие на *Salmonella* spp. се констатира само през топлия сезон.

Нашите данни потвърждават становището на Yilmaz et al. (2005) за незначително разпространение на *Salmonella* spp. в живи миди.

При сравняване на нашите резултатите за *Salmonella* spp с тези на други автори се констатира определено различие. При проучвания, проведени в България (Михов и Златанова, 1983), Италия (Ripabelli et al., 1999) и Хърватия (Popvic et al., 2012) също не са открити *Salmonella* spp. в проби от молюски.

От изследваните 5 съмнителни изолати чрез биохимични и серологични тестове, два са идентифицирани като *S. Senftenberg* и *S. Give*.

Изследванията на Sulaj et al. (2008) представят голямо видово разнообразие от салмонели в мидите. Преимуществено се открива *S. Typhimurium*, следвана от *S. Lindenburg* и *S. Risen*.

### 3.3.3. Установяване на *Listeria monocytogenes* в месо и вътречерупкова течност от живи миди

Резултатите от проведените анализи са изложени в табл. 6.

**Таблица 6. Наличие на *Listeria* spp. в живи миди от българското черноморие и Средиземно море в зависимост от сезона**

Местонахождение	Топъл сезон		Студен сезон	
	Общ брой изследвани проби	Положителни проби	Общ брой изследвани проби	Положителни проби
Южно черноморие	5	0	13	0
Северно черноморие	15	2	8	0
Средиземно море	4	0	42	1

Данните от таблицата показват, че от 87 изследвани проби, в 3 се доказва наличие на *Listeria* spp. Положителните находки са регистрирани при 2 проби живи миди от Северното черноморие и в 1 проба живи миди от Средиземно море. Следва да се отбележи, че при българските миди *Listeria* spp. се установява само през топлия сезон, докато при средиземноморските миди находката е през студения сезон.

Нашите резултати не се различават съществено от данните на други автори за разпространението на *Listeria* spp сред морските хидробионти. В проучванията си Hu et al. (2006) доказват, че 9 % от изследваните проби двучерупчести мекотели са положителни за *Listeria* spp. като преобладаващ вид е *L. monocytogenes*.

Проведените допълнителни биохимични и серологични изследвания показват, че 2 от изолатите се идентифицират като *L. monocytogenes* и 1 - *L. innocua* (табл. 7).

**Таблица 7. Видов състав на *Listeria* spp. в живи миди**

Произход на мидите	Общ брой изследвани проби	Брой положителни проби	Вид
Южно черноморие	18	0	<i>L. monocytogenes</i>
Северно черноморие	23	2	<i>L. monocytogenes</i>
Средиземноморски миди	46	1	<i>L. innocua</i>

Произходът на типизираните листерии е различен. *L. monocytogenes* се доказва само в живи миди от Северното черноморие, а *L. innocua* – в живи миди от Средиземно море.

При проучване у нас, проведено от Гюрова (2009) се констатира, че рибата и рибните продукти са рискова група по отношение на *L. monocytogenes*. Подобна теза застъпват и Memosi and Sulaj (2010) при анализ на живи миди в Албания. Те откриват наличие на *L. monocytogenes* в 5,1 до 7,2 % от изследваните проби.

Представените данни ни дават основание да направим заключение, че *L. monocytogenes* е рисков патоген в двучерупчести мекотели, които се консумират в редица случаи без задължителна топлинна обработка.

### **3.3.4. Определяне съдържанието (MPN/g) на коагулазоположителни стафилококи (*S. aureus*) в месо и вътречерупкова течност от живи миди.**

Данните за разпределението на пробите живи миди според съдържанието на коагулазоположителни стафилококи е отразено на табл. 8.

**Таблица 8. Разпределение на пробите в зависимост от произхода и количеството (MPN/g) на коагулазоположителни стафилококи**

Местонахождение	Най-вероятен брой – MPN/g			
	Брой изследван и проби	< 1 x 10 <sup>1</sup>	до 9,9 x 10 <sup>2</sup>	до 9 x 10 <sup>3</sup>
Южно черноморие	18	12	3	3
Северно черноморие	23	12	9	2
Средиземно море	46	44	2	0

От изложените данни става ясно, че най-голяма е групата на пробите с количество <math>1 \times 10^1</math> MPN/g, включваща миди от Южното, Северното черноморие и

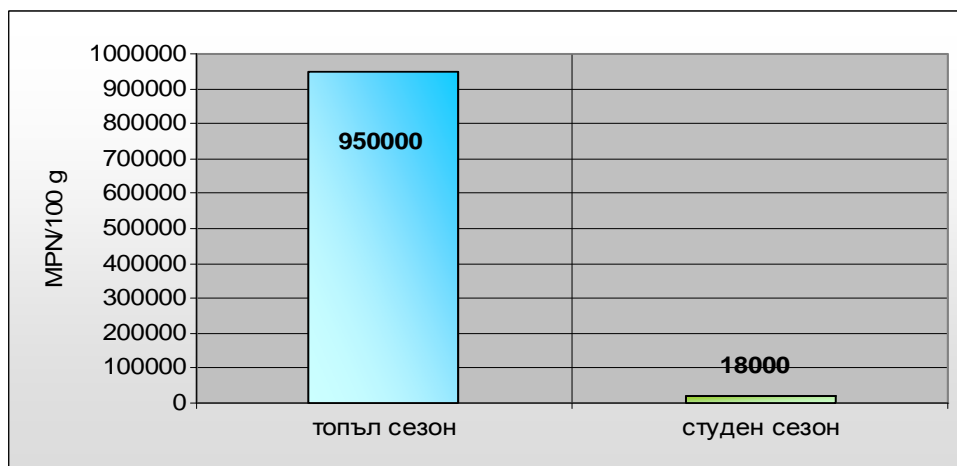
средиземноморските миди. На второ място е категорията проби от Северното, Южното черноморие и Средиземно море, съдържаща до  $9,9 \times 10^2$  MPN/g стафилококи. Най-малък е делът на пробите, отнасящи се към третата категория с количество до  $9 \times 10^3$  MPN/g: 3 за миди от Южното черноморие и 2 от Северното черноморие и нито една проба от средиземноморските живи миди.

Най-високо съдържание на коагулазоположителни стафилококи ( $2,3 \times 10^3$  MPN/g) е установено в месо и вътречерупкова течност от живи миди през топлия сезон с произход от Южното черноморие.

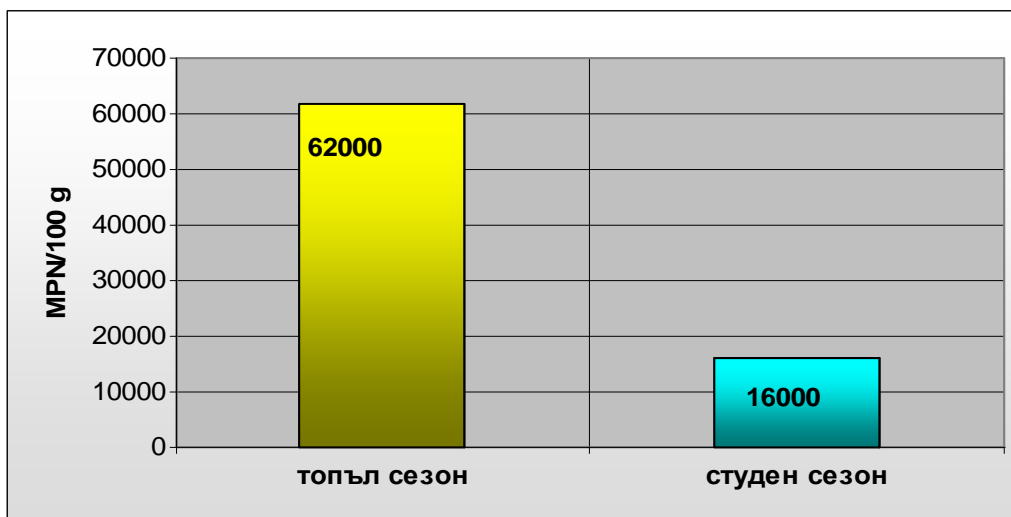
Нашите резултати за разпространение на *S. aureus* в български и средиземноморски миди показват по-високи количествени стойности в сравнение с данните на Pereira et al. (2006). От изследвани 90 проби те доказват наличие на стафилококи в стриди само при една с количество 80 cfu/g.

### 3.3.5. Определяне съдържанието на *E.coli* (MPN/100 g) в месо и вътречерупкова течност от живи миди.

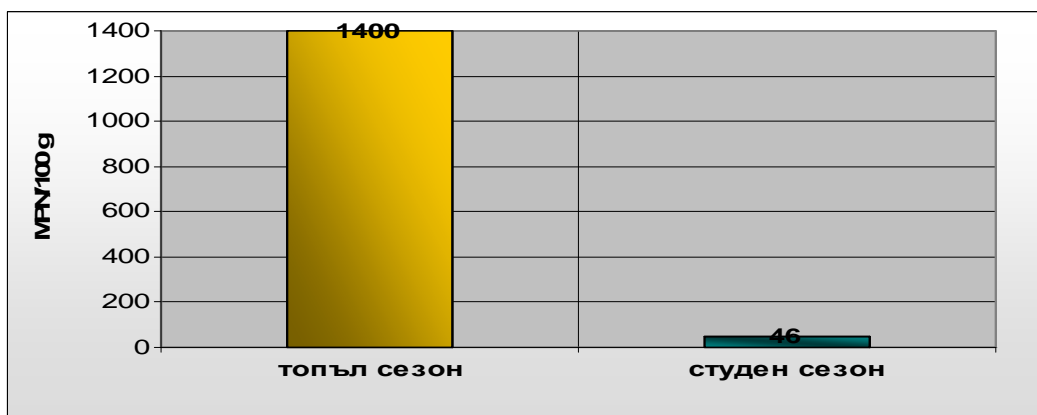
Средното количество на *E. coli* в живи миди в зависимост от произхода и сезона на добив е отразено на фиг. 2, 3 и 4.



**Фигура 2. Съдържание на *E. coli* (MPN/100 g) в живи миди от Северното черноморие в зависимост от сезона.**



**Фигура 3.** Съдържание на *E. coli* (MPN/100 g) в живи миди от Южното черноморие в зависимост от сезона.



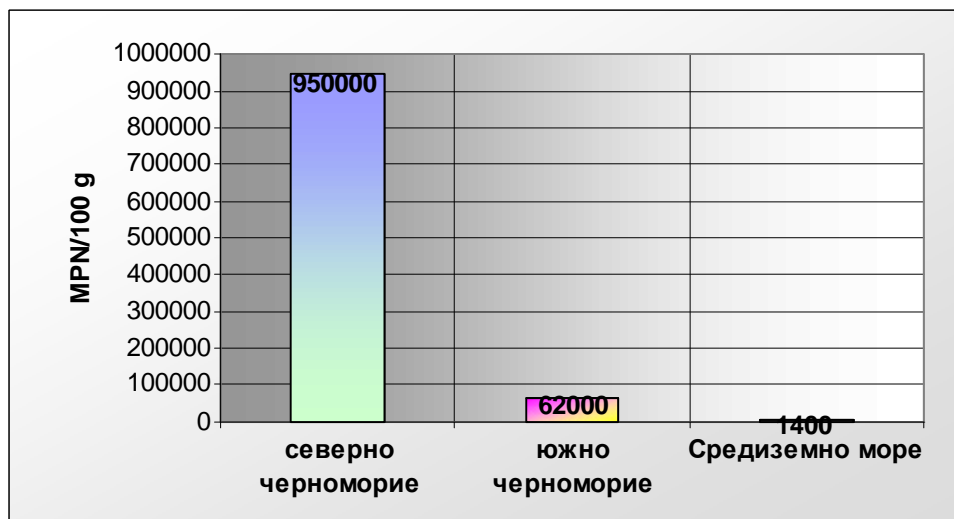
**Фигура 4.** Съдържание на *E. coli* (MPN/100 g) в живи миди от Средиземно море в зависимост от сезона.

От изнесените резултати се вижда, че най-високи стойности на *E. coli* се регистрират в живи миди от Северното черноморие през топлия сезон –  $9,5 \times 10^5$  MPN/100 g.

Данните от изпитванията показват, че най-вероятния брой на *E. coli* в месо и вътречерупкова течност от живи миди е значително по-висок през топлите месеци независимо от произхода на изследваните проби.

На фиг. 5 са представени сравнителни данни за количеството на *E. coli* на живи миди през топлия сезон, в зависимост от техния произход.

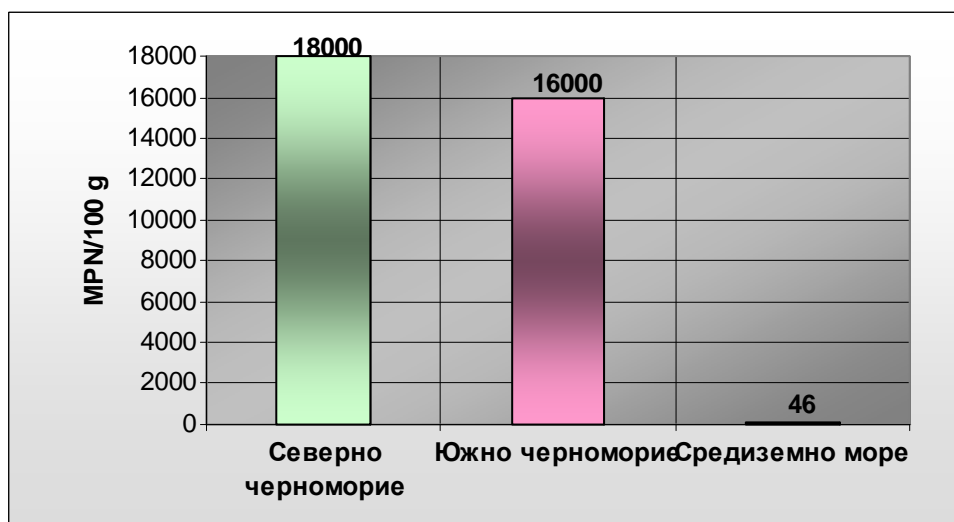




**Фигура 5. Количество на *E. coli* (MPN/g) в живи миди през топлия сезон.**

От фигурата е видно, че количеството на *E. coli* в живите миди през топлия сезон е най-високо в пробите от Северното черноморие ( $9,5 \times 10^5$  MPN/100 g) и най-ниско в пробите от Средиземно море ( $1,4 \times 10^3$  MPN/100 g).

През студения сезон се установяват отново ниски стойности на *E. coli* в средиземноморските миди. При живите миди от Северното и Южното черноморие най-вероятния брой на *E. coli* достига  $1,8 \times 10^4$  MPN/100 g и  $1,6 \times 10^4$  MPN/100 g (фиг.6).



**Фигура 6. Количество на *E. coli* (MPN/g) в живи миди през студения сезон.**

Подобни резултати са докладвани от Croci et al. (2000). При изследване на 36 проби миди от Адриатическо море в 19,4 % от пробите авторите доказват съдържание на *E. coli* над допустимите граници. В своите проучвания Sulaj et al. (2006) откриват високи стойности на *E. coli* във вода с фекално замърсяване – до  $1,7 \times 10^3$  MPN/100 g

през зимните месеци и до  $9,1 \times 10^4$  MPN/100 g – през летните. Тези констатации са в съответствие с установено от нас по-голямо съдържание на *E. coli* в мидите през летните сезони, независимо от техния произход. Изследвания в тази насока са проведени и от български колектив (Михов и Златанова, 1983) през 80<sup>те</sup> години на миналия век, които доказват по-високо фекално замърсяване на диви и култивирани черноморски миди през летните месеци.

На табл. 9 е представено разпределението на пробите живи миди според съдържанието на *E. coli*.

**Таблица 9. Разпределение на пробите живи миди според съдържанието на *E. coli***

Местонахождение	Най-вероятен брой - MPN/100 g			
	Брой изследвани проби	< $2 \times 10^1$	до $2,3 \times 10^2$	> $2,3 \times 10^2$
Южно черноморие	18	6	6	6
Северно черноморие	23	5	4	14
Средиземно море	46	30	14	2

Анализа на резултатите показва, че преобладава делът на пробите с много ниско съдържание на *E. coli* ( $< 2 \times 10^1$  MPN/100 g). Броят на пробите с MPN/100 g до 230 и тези с MPN/100 g над  $2,3 \times 10^2$  е еднакъв.

От изследванията на Sonier et al. (2008) е видно, че лимита от 230 MPN/100 g месо и вътречерупкова течност не се превишава, когато моллюските се отглеждат във висок воден стълб, но не и когато са разположени по дъното на водните басейни. Установено е, че над 50% от дънните двучерупчести мекотели са по-замърсени от мидите, отглеждани на висящи колектори във водата. В нашите проучвания обаче откриваме голямо количество на *E. coli* в българските миди, добити и при колекторно отглеждане на значителна височина от морското дъно.

### **3.3.6. Определяне на общия брой микроорганизми (ОБМ) в месо и вътречерупкова течност от живи миди**

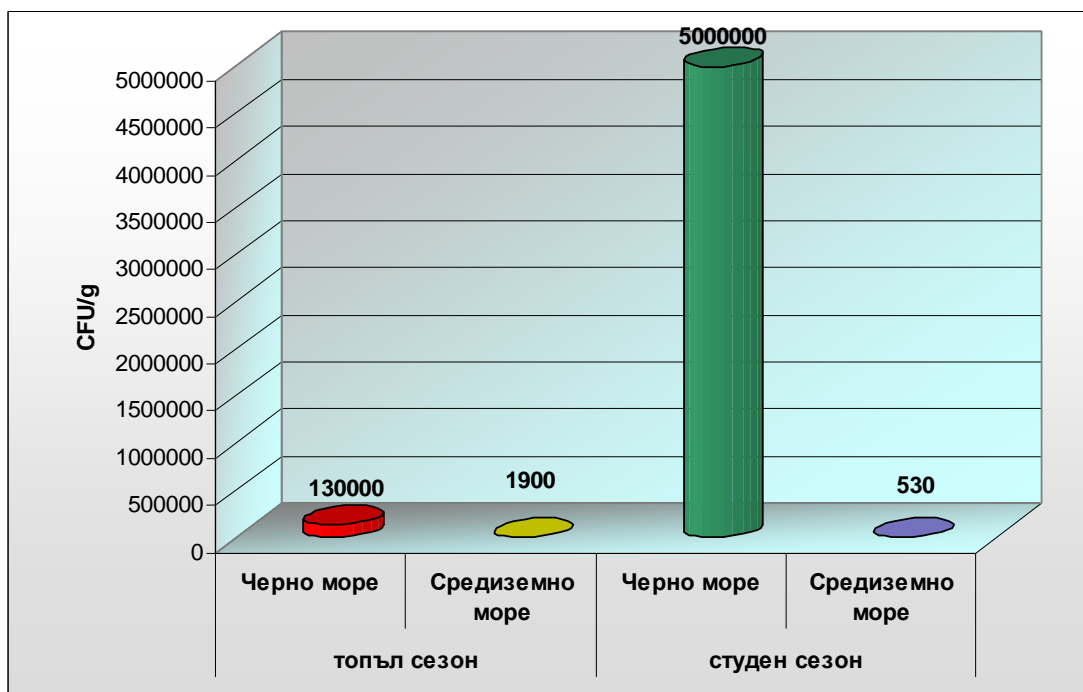
Резултатите от разпределението на пробите живи миди според общия брой микроорганизми са отразени на табл. 10.

**Таблица 10. Разпределение на пробите живи миди според общия брой микроорганизми (CFU/g).**

Местонахождение	Брой изследвани проби	$1 \times 10^1$ до $9 \times 10^3$	от $1 \times 10^4$ до $9 \times 10^4$	$> 1 \times 10^5$
Южно черноморие	18	6	9	3
Северно черноморие	23	8	8	7
Средиземно море	46	42	4	0

От таблицата се вижда, че пробите са разпределени в три категории (I-III) според ОБМ: I - от  $1 \times 10^1$  до  $9,9 \times 10^3$  CFU/g, II - от  $1 \times 10^4$  до  $9,9 \times 10^4$  CFU/g и III -  $> 1 \times 10^5$  CFU/g. Най-голям дял заемат пробите от I категория при средиземноморски миди. В III категория не е отнесена нито една проба от средиземноморските диви миди. За пробите от Северното черноморие се констатира сравнително равномерно разпределение във всички категории с малък превес за третата категория. При мидите от Южното черноморие доминират пробите от втора категория. Най-малък е броят на пробите от III категория.

При съпоставяне на данните за ОБМ на черноморските и средиземноморските миди в зависимост от сезона е видно, че бактериалното замърсяване на черноморските миди е значително по-високо от това на средиземноморските (фиг. 6).

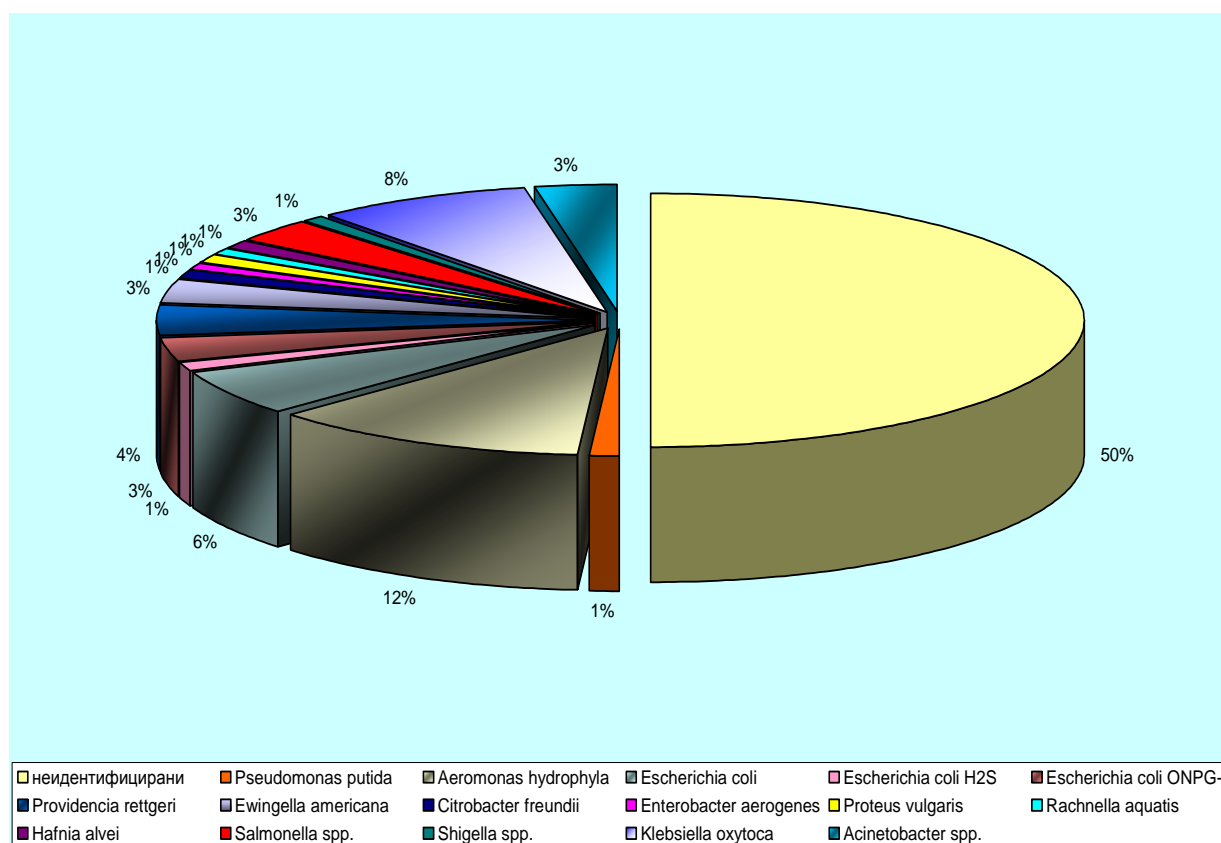


**Фигура 6. ОБМ (CFU/g) в месо и вътречерупкова течност от живи миди в зависимост от произхода и сезона.**

Нашите данни са в подкрепа на констатациите, направени от Roldan et al. (2011), които доказват в 89% от пробите ОБМ над  $1 \times 10^3$  cfu/g. Подобни резултати са получени при предишни български изследвания от Михов и Златанова (1983). Те установяват ОБМ в граници от  $4 \times 10^3$  cfu/g до  $1 \times 10^5$  cfu/g при анализ на култивирани миди, отглеждани в близост до остров „Св. Иван” на Южното черноморие. Посочените данни обаче се свързват с определена сезонност.

### 3.3.7. Определяне на видовия състав на бактериални щамове от живи миди

На фиг. 7 е отразено процентното разпределение на идентифицираните видове микроорганизми в месо и вътречерупкова течност от живи миди със системата MICRONAUT-6 (MERCK).



**Фигура 7. Видов състав на микроорганизмите (%) в месо и вътречерупкова течност от живи миди, определени със системата MICRONAUT-6 (MERCK).**

Данните от фигурата показват, че процентът на неидентифицираните щамове със системата MICRONAUT-6 (MERCK) е значителен (50%). От идентифицираните видове най-голям дял заема *A. hydrophila* (12%), следван от *K. oxytoca* (8%) и *E. americana* (6%). Сравнително по-малко е присъствието на *E. coli*, разпределено в 3 биохимични групи: *E. coli* ONPG(-) (3%), *E. coli* H<sub>2</sub>S(+) (1%) и *E. coli* (6%).

Наличието на *A. hydrophilla* в 12% сред изолираните щамове или в 3% от изследваните проби живи миди потвърждава установеното от други автори по-широко разпространение на този вид. Поради естественото му обитание в морската среда, той може да се разглежда като рисков фактор в етиологията на хранителни заболявания от морски храни. В свое съобщение Ottaviani et al. (2006) докладват за присъствие на *Aeromonas* spp. в 12% от всички микроорганизми, изолирани от миди в Адриатическо море.

При анализите се доказва наличие и на някои микроорганизми, разпространени в морската вода: *H. alvei*, *R. aquatis* и *P. rettgeri* (по 1 %). Представителите на сем. *Enterobacteriaceae* заемат 2 % сред всички видове, изолирани от живите миди.

Съдържанието някои други морски бактерии в мидите е проучено от Pujalte et al. (1999). При изследване на средиземноморски стриди авторите идентифицират представители на родовете *Shewanella*, *Pseudomonas* и *Hafnia*.

Обобщените резултати от биохимичната характеристика на щамове от живи миди със системата MICRONAUT-6 свидетелстват, че е на лице определена вариабилност в редица показатели, поради което е необходимо същите да се оценяват предпазливо в контекста на тяхната значимост.

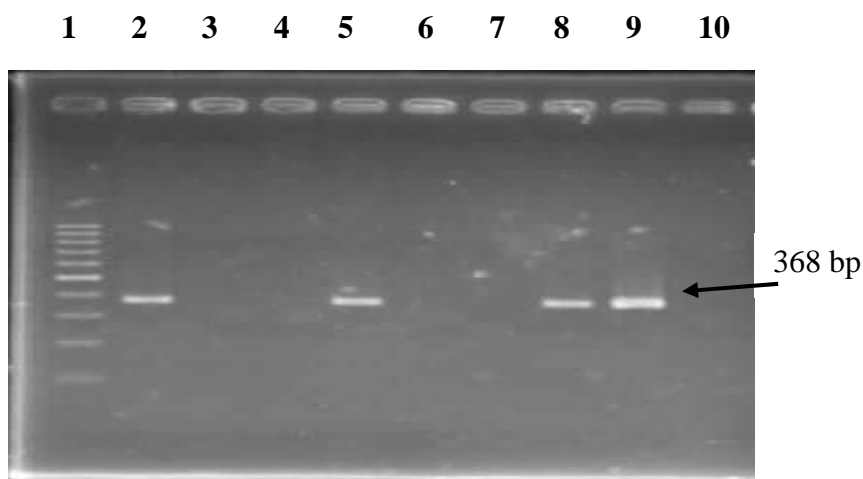
### 3.3.8. Доказване на патогенни *Vibrio* spp. с конвенционална полимеразно-верижна реакция (PCR).

Резултатите от извършените изследвания са представени на табл. 11.

**Таблица 11. Наличие на специфични гени при *V. parahaemolyticus*.**

Вид	Брой изолати, изолирани от живи миди	Положителни за toxR-ген	Положителни за tdh-ген	Положителни за trh-ген
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	43	11	0	0

От изложеното е видно, че сред проучваните 43 изолата *V. parahaemolyticus* присъствие на ToxR ген се установява само при 11 изолата. Визуализирането на ампликона с UV трансилуминатор е с големина 368 bp (фиг. 8).

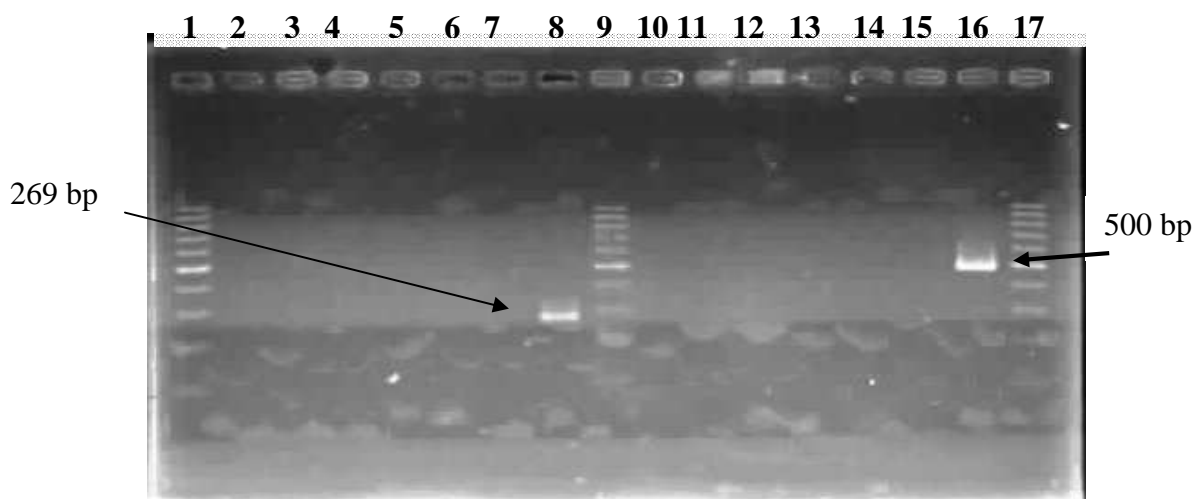


**Фигура 8. PCR. Наличие на ToxR ген във *V. parahaemolyticus* от живи миди.**

Легенда: 1 –маркер на молекулярни размери (100 bp ДНК стълб) ; 2, 5 и 8 – *V. parahaemolyticus* потвърден изолат; 10 - PCR-отрицателна контрола; 9 – PCR-положителна контрола (ДНК,съдържаща toxR ген).

Подобни резултати са получени от Dileep et al. (2003) и Zulkifli et al. (2009), които идентифицират *V. parahaemolyticus* на база на ToxR-ген. Dileep et al. (2003) определят *V. parahaemolyticus* чрез ToxR-ген в 28 от 32 изолата с атипични биохимични отнасяния. Zulkifli et al. (2009) откриват видово специфичен ген в 50 % от изследваните щамове, изолирани от миди.

Всички изолати са изследвани за наличие на гените, кодиращи термостабилния директен хемолизин (tdh) и термостабилния свързан хемолизин (trh). В нито една от изследваните проби не се установява наличие на гени, свързани с патогенността (фиг. 9).



**Фигура 9. PCR. Наличие на гени, свързани с патогенността в щамове *V. parahaemolyticus* от живи миди.**

Легенда: 1, 9 и 17 – маркери на молекулярни размери (100 bp ДНК стълб) ; 8 – PCR-положителна контрола (ДНК,съдържаща tdh ген); 16 – PCR-положителна контрола (ДНК,съдържаща trh ген), 7 и 15 - PCR-отрицателна контрола;

Тези резултати са в съответствие с предишни проучвания, свързани с липса или много слабо присъствие на tdh и trh гени в двучерупчести мекотели (Ripabelli et al., 1999; Hervio-Heath et al., 2002; Dileep et al.).

За разлика от цитираните автори група изследователи от Средиземно море (Terzi et al., 2009) проучват изолати на *V. parahaemolyticus* в различни морски храни от турското крайбрежие на Черно море и доказват патогенни гени - в 13 на tdh-ген и в 6 на trh-ген. В 13 от пробите откриват и двата гена – tdh и trh.

Използването на ДНК от контролен щам *V. parahaemolyticus* EURL V05/14 показва, че реакциите за откриване на tdh и trh са оптимизирани и използвани правилно. В края на реакцията положителната контрола генерира продукти с очакваните с размери - 269 и 500 bp.

### **3.3.9. Доказване на норовируси в месо и вътречерпукова течност от живи миди**

При изследването на 47 проби живи миди чрез полимеразно-верижна реакция в реално време (real-time TaqMan PCR, предхождан от стъпка на обратна транскрипция) спрямо норовируси от геногрупи I и II бяха установени 11 положителни находки за норовируси (23,4%). Във всички норовирус-позитивни пула бяха установени само

норовируси от геногрупа GII. В една от изследваните проби миди бяха отчетени положителни резултати и за геногрупа GI (табл. 12).

**Таблица 12. Наличие на норовируси в месо и вътречерупкова течност от живи миди с различен произход.**

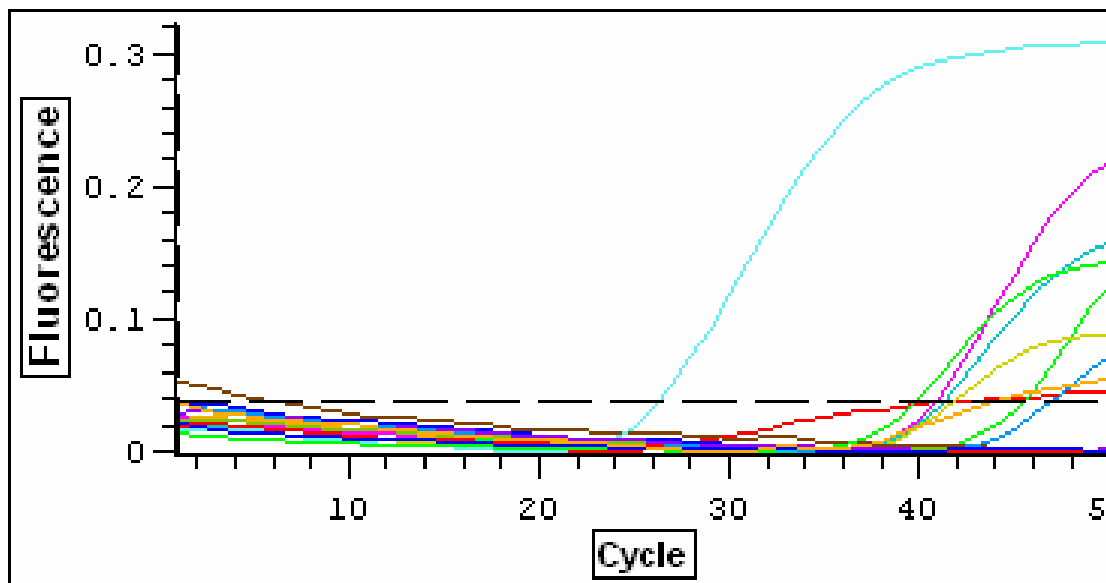
Норовируси геногрупа	Български миди		Турски миди	
	Брой изследвани проби	Брой положителни проби (%)	Брой изследвани проби	Брой положителни проби (%)
Норовируси от геногрупа GI	15	1 (6,0%)	32	0 (0%)
Норовируси от геногрупа GII	15	9 (60,0%)	32	2 (6,3%)

От изложените данни е видно, че в изследваните 15 проби български черноморски миди от Северното и Южното черноморие при 9 са регистрирани положителни резултати за норовирус GII (60 %) и в 1 (6,0 %) за норовирус GI. При анализа на 32 проби живи диви миди от Средиземно море за норовирус GII само в 2 проби (6,25 %) е намерена положителна находка.

Yilmaz et al. (2010) са изследвали 110 проби миди и доказват присъствие на норовируси от геногрупа GII. Норовируси от геногрупа GI не са открити в нито една проба. Vilariano et al. (2009) изтъкват, че норовируси от геногрупа GII се срещат в 53% от изследваните проби двучерупчести мекотели. подобно на нашите данни, те също отчитат и присъствие на норовируси от геногрупа GI в 1 проба от диви миди.

Положителният сигнал (ct value) в TaqMan PCR анализа на проби живи миди от България и Средиземно море варира между 29,1 и 45,5 цикъл (фиг.10). Изследваните проби бяха разделени на две основни групи – високо-позитивни със Ct value под 40 (позитивен сигнал в диапазона 25-38 цикъл) и ниско-положителни, чието Ct value е над 40, диапазона 40-48-ми цикъл.





**Фигура 10.** Резултати от TaqMan RT-PCR на живи миди с праймери за доказване на норовируси от геногрупа GII.

Положителните проби за норовируси от геногрупа GII в живи миди демонстрират добър флуоресцентен сигнал след real-time TaqMan PCR.

Липсата на флуоресценция при изследването за норовируси от геногрупа GI и при отрицателните контроли, както и появата ѝ при положителните контроли (Norovirus/Hu/GI.4/BG629/2009/BUL, НЦЗПБ-София) доказва вероятно отсъствие на вирусни частици или отсъствие на норовируси GI в анализиранияте проби живи миди от българското черноморие и Средиземно море. Положителен сигнал е визуализиран само при една проба от живи миди от Българското черноморие.

При сравняване на данните от бактериологичните и вирусологичните изпитвания се установяват някои закономерности (табл. 13).

**Таблица 23.** Обобщени данни от микробиологични и вирусологични изследвания на живи двучерупчести миди с различен произход

Пореден номер	Произход	NoV GII (цикъл)	ОБМ (CFU/g)	E. coli (MPN/100 g)	Коагулазоположителни стафилококи (MPN/g)	Наличие на патогенни бактерии в 25 g
1	Средиземно море	33,4	$1,7 \times 10^3$	$< 2 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	-
2	Средиземно море	45,5	$2,6 \times 10^4$	$4 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	-
3	България	29,1	$1,1 \times 10^4$	$< 2 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	-
4	България	38,7	$6,4 \times 10^4$	$2 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	-

5	България	36,0	$5,3 \times 10^3$	$<2 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	-
6	България	37,7	$2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$4,3 \times 10^1$	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. mimicus</i>
7	България	40,8	$1,4 \times 10^6$	$>1,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^1$	<i>V. parahaemolyticus</i>
8	България	32,3	$1,6 \times 10^6$	$>1,8 \times 10^4$	$< 1 \times 10^1$	<i>V. parahaemolyticus</i>
9	България	33,8	$6,4 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$	$< 1 \times 10^1$	-
10	България	33,3	$7,5 \times 10^3$	$>1,8 \times 10^4$	$< 1 \times 10^1$	-
11	България	38,7	$6,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	-

**ЗАБЕЛЕЖКА:** В таблицата са включени само данните за пробите месо и вътречерупкова течност от живи миди, в които е установено наличие на норовируси

Изложените резултати свидетелстват, че не във всички случаи се откриват норовируси в проби с високо фекално замърсяване. Само в 5 от пробите (с висок брой на *E. coli*) се доказва наличие на норовируси. В останалите 6 проби, най-вероятния брой на *E. coli* е в границите от  $<2 \times 10^1$  до  $4 \times 10^1$  MPN/100 g.

В 3 от положителните проби за норовируси в черноморски миди се констатира наличие на *V. parahaemolyticus*, като в една от пробите присъства и *V. mimicus*. В нито една от тях обаче не се откриват други патогенни микроорганизми.

Тези данни потвърждават информацията на Yilmaz et al. (2005) за съществуване на определена връзка между ОБМ, *E. coli* и *S. aureus*. За разлика от Hood et al. (1983) ние откриваме *Salmonella* spp. в проби живи миди, където най-вероятния брой на *E. coli* е в допустимите лимити. Други несъответствия с микробиологичния и вирусологичния статус на изследваните миди не са установени.

Тези данни потвърждават информацията на Yilmaz et al. (2005) за съществуване на определена връзка между ОБМ, *E. coli* и *S. aureus*. За разлика от Hood et al. (1983) ние откриваме *Salmonella* spp. в проби живи миди, където най-вероятния брой на *E. coli* е в допустимите лимити. Други несъответствия с микробиологичния и вирусологичния статус на изследваните миди не са установени.

Общото бактериално замърсяване на живите миди също не е в пряка зависимост от наличието на норовируси в мидите. Само в 5 от положителните за норовируси проби общият брой на микроорганизмите (ОБМ/g) е под 8000 cfu/g. Относно най-вероятния брой на коагулазоположителни стафилококи е видно, че само в 2 проби се отчита незначително присъствие на *S. aureus* в границите на една степен ( $10^1$ ).

Тези данни потвърждават становището на Yilmaz et al. (2010) за отсъствие на пряка зависимост между съдържанието на *E. coli* и положителните и отрицателните находки за норовируси в изследваните миди.

Съществуващото европейско законодателство изисква задължителен микробиологичен мониторинг, относно количеството на *E. coli* като индикатор за санитарното качество на моллюските и акваториите за техния добив (Регл. 2073/2005 и Регл.854/2004). Изследванията в това направление показват, че прилаганите техники за пречистване на мидите водят до понижаване количеството на *E. coli* в установените лимити, но не дават гаранции за редуциране или елиминиране на норовирусите в тях (EFSA, 2011).

От проведените подробни изследвания може да се направи извод, че регламентираните в европейското законодателство микробиологични критерии за мониторинг на *E. coli* в двучерупчести мекотели не са достатъчно ефективни за осигуряване на тяхната здравна безопасност. Евентуалното присъствие на норовируси в живите миди с ниско съдържание на *E. coli* не може да бъде изключено. Това налага въвеждане на допълнителен вирусологичен мониторинг при производството на живи двучерупчести моллюски.

#### 4.ИЗВОДИ

1. Наблюдава се ясно изразена сезонност в разпространението на вибрионите в българските миди през топлите месеци. При дивите миди от Средиземно море вибриони се намират при 6 от изследваните 46 проби, предимно през студения сезон.
2. Присъствие на *Salmonella* spp. се регистрира само в 2 от изследваните общо 87 проби живи миди. Салмонели се откриват само в българските миди през топлите месеци. Видовият състав е представен от *S. Senftenberg* и *S. Givae*.
3. *Listeria* spp. се откриват в 3 от изследваните 87 проби живи миди. Преобладава наличието ѝ в българските миди от Северното черноморие (2 проби) с изразена сезонност през топлите месеци. От типизираните щамове *Listeria* spp. се доказват *L. monocytogenes* (в 2 проби) и *L. innocua* (в 1 проба). *L. monocytogenes* се отнася към II серогрупа (O-V, VI).
4. Най-вероятния брой на коагулазоположителни стафилококи в живи миди варира от  $< 1 \times 10^1$  до  $9,2 \times 10^3$  MPN/g. Най-високо е съдържанието им в българските миди от Северното черноморие през топлия сезон. Сред всички

- изследвани проби, независимо от произхода им преобладава категорията със съдържание на коагулазоположителни стафилококи под  $1 \times 10^1$  MPN/g.
5. Най-вероятния брой на *E. coli* (MPN/100 g) в мидено месо и вътречерупкова течност от живи миди варира от  $<2 \times 10^1$  до  $9,2 \times 10^6$ . При мидите от Северното черноморие през топлия сезон е установено максимално съдържание на *E. coli* –  $9,2 \times 10^6$  MPN/100 g. В живите миди от Южното черноморие се доказва най-високо количество също през топлия сезон –  $1,5 \times 10^5$  MPN/100 g. При дивите миди с произход от Средиземно море се открива съдържание на *E. coli* от  $5,4 \times 10^3$  MPN/g през топлите месеци. Най-вероятния брой на *E. coli* в месо и вътречерупкова течност от живи миди е значително по-висок през топлия сезон, независимо от произхода на мидите.
  6. При 45 от изследваните 87 проби живи миди от българското черноморие и Средиземноморието се установява, че количеството на *E. coli* (MPN/100 g) е над допустимите стойности от 230 MPN/100 g.
  7. Общият брой на микроорганизмите (cfu/g) в месо и вътречерупкова течност от живи миди варира от  $5,5 \times 10^2$  до  $4,7 \times 10^6$ . При мидите от Южното черноморие се установи най-високо бактериално съдържание през студения период -  $4,7 \times 10^6$  cfu/g. Най-ниско е съдържанието на ОБМ при средиземноморските миди през студения сезон –  $5,5 \times 10^2$ . Представителите на сем. *Enterobacteriaceae* заемат 2 % сред всички видове, изолирани от живите миди
  8. При типизирането на 97 щама, изолирани от живи миди, със системата MICRONAUT-6 се доказва най-голямо разпространение на *A. hydrophila* (12%), следван от *K. oxytoca* (8%) и *E. americana* (6%). Доказва се и наличие на някои микроорганизми, разпространени в морската вода: *H. alvei*, *R. aquatis* и *P. rettgeri* (по 1 %).
  9. По-добри възможности за биохимично типизиране на бактериални щамове, изолирани от живи миди се установяват при използване на системата API 20E.
  10. От типизираните 132 щама вибриони, най-голям дял заема *V. parahaemolyticus* (74 %). Значително по-рядко се доказва *V. alginolyticus* (16 %), *V. mimicus* (5 %) и *V. cholerae* (5 %). С полимеразо-верижна реакция се доказва наличие на ToxR-ген в 11 от изследваните 43 изолата *V. parahaemolyticus*. В нито един от доказаните *V. parahaemolyticus* не се откриват *tdh* и *trh* патогенните гени.

11. Норовируси се откриват в 11 от 47 изследвани проби черноморски и средиземноморски миди. В мидите от Черно море, честотата на откриване на норовируси е по-голяма в сравнение с живите миди от Средиземно море.
12. Норовирусите в живите миди се отнасят към геногрупа GII. В една от положителните проби се доказва едновременно наличие на норовируси от геногрупи GI и GII.
13. Приложената техника на real-time TaqMan PCR за откриване на норовируси в живи миди е бърза, точна и приложима в рутинната лабораторна практика.
14. Присъствието на норовируси в живи миди не винаги е в корелация с високото съдържание на *E. coli*. Само в 5 от пробите с висок брой на *E. coli* се доказва наличие на норовируси.

## 5.ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. **Гюрова, Е.** Наличие на *Listeria monocytogenes* в хранителни продукти от животински произход. // *Сб. Научни Доклади «Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт» - 108 години обществено полезна научноизследователска и приложна дейност*, София, 2009, 31-35.
2. **Михов, П. и С. Златанова.** Физико-химична и микробиологична характеристика на култивирани миди. // *Ветеринарна сбирка*, 1983, № 9.
3. **Bauer, A., Ó. Óstensavik, M. Florvag, Ó. Órmen, L. Rórvik.** Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. vulnificus* in Norwegian Blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*). // *Applied and Environmental Microbiol.*, 2006, vol. 72, 3058-3061.
4. **Croci, L., D. DeMedici, C. Scalfaro, A. Fiore, M. Divizia, D. Donia, A. Cosentino, P. Moretti, G. Costantini.** Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. // *Journal of Applied Microbiol.*, 2000, vol. 88, 293-298.
5. **Dileep, V., H. Kumar, J. Kumar, M. Nishibuchi, I. Karunasagar, I. Karunasagar.** Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. // *Letters in Applied Microbiology*, 2003, vol. 36, 423-427.
6. **EFSA, Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. // *EFSA Journal*, 2011, vol. 9 (7), 2190
7. **Food and Drug Administration (FDA);** Centre for Food safety and Applied Nutrition, 2005. Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio*

*parahaemolyticus* in raw oysters. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/acrobat/vpra.pdf>.  
Accessed 15<sup>th</sup> July 2010.

8. **Hevio-Heath, D., R. Colwell, A. Derrien, A. Robert-Pilot, J. Fournier, M. Pommepeuy.** Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. // *Journal of Applied Microbiology*, 2002, vol. 92, 1123-1135.
9. **Hewit, J. & G. Greening.** Effect of heat treatment on hepatitis A virus and norovirus in New Zealand greenshell mussels (*Perna canaliculus*) by quantitative real-time reverse transcription PCR and cell culture. // *Journal of Food Protec.*, 2006, vol. 69 (9), 2217-2223.
10. **Hood, M., G. Ness, N. Blake.** Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in shellfish. // *Applied and Environmental Microbiol.*, 1983, vol. 45 (1), 122-126.
11. **Hu, Y., K. Gall, A. Ho, R. Ivaner, Y. Gröhn, M. Wiedmann.** Daily variability of *Listeria* contamination patterns in a cold-smoked salmon processing operation. // *Journal of Food Protec.*, 2006, vol. 69 (9), 2123-2133.
12. **Kishishita, M., N. Matsuoka, K. Kumagai, S. Yamasaki, Y. Takeda, M. Nishibuchi.** Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. // *Applied Environmental Microbiology*, 1992, vol. 58, 2449-2457.
13. **Kroneman, A., H Vennema, J Harris, G Reuter, C-H von Bonsdorff, K-O Hedlund, K Vainio, V Jackson, P Pothier, J Koch, E Schreier, B Böttiger, M Koopmans.** Increase in norovirus activity reported in Europe. // *Eurosurveillance Weekly*, 2006, vol. 11 (50)
14. **Kumar, H., S. Otta, I. Karunsagar, I. Karunsagar.** Detection of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. // *Letters in Applied Microbiol.*, 2001, vol. 33, 334-338.
15. **Martinez-Urtaza, J., A. Lozano-Leon, J. Varela-Pet, J. Trinanes, Y. Pazos, O. Garcia-Martin.** Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. // *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, vol. 74, 265-274.
16. **Memoci, H & K. Sulaj.** Contamination with *Listeria monocytogenes* (Murray, 1923) of live *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819 collected from Butrini Lagoon (Southern Albania). // *Natura Montenegro*, Podgorica, 2010, vol. 10 (2), 143-148.
17. **Miller, W., M. Miller, I. Gardner, E. Atwill, B. Byrne, S. Jang, M. Harris, J. Ames, D. Jessyp, K. Worcester, A. Melli, P. Courad.** *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Cloustridium perfringens* and *Plesiomonas shigelloides* in marine and freshwater invertebrates from coastal California ecosystems. // *Microbial Ecology*, 2006, vol. 52 (2), 198-206.

18. **Ottaviani, D., S. Santarelli, S. Bacchiocchi, L. Masini, C. Ghittino, I. Bacchiocchi.** Occurrence and characterisation of *Aeromonas* spp. in mussels from Adriatic Sea. // *Food Microbiol.*, 2006, vol. 23 (5), 418-422.
19. **Pereira, M., M. Nunes, L. Nuernberg, D. Schulz, C. Batista.** Microbiological quality of oyster (*Crassostrea gigas*) produced and commercialised in the coastal region of Florianopolis – Brazil. // *Brazilian Journal of Microbiology*, 2006, vol.37, 159-163.
20. **Popovic, T., A. Skukan, P. Dzidara, R. Coz-Rakova, I. Strunjak-Perovic, L. Kozacinski, M. Jadan, D. Brlek-Gorski.** Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic Coast of Croatia. // *Veterinarni Medicina*, 2012, vol. 55 (5), 233-241.
21. **Potasman, I., A. Pez, M. Odeh.** Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. // *Clinical Infections Disease*, 2002, Vol. 35, 921-928.
22. **Pujalte, M., M. Ortigosa, M. Macian, E. Garay.** Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to the Mediterranean oysters and seawater. // *Internat. Microbiology*, 1999, vol. 2 (4), 259-266.
23. **Reilly, P. & D. Twiddy.** *Salmonella* and *Vibrio cholerae* in brackishwater tropical prawns. // *Journal of Food Microbiol.*, 1992, vol. 16, 293-301.
24. **Richards, G., Kingslay, G., Baker, J.,** Researches study microbial threats to shellfish safety. *Agricultural Research*, 2005, <[www.nps.ars.usda.gov](http://www.nps.ars.usda.gov)>
25. **Ripabelli, G., M. Sammarco, G. Grasso, I. Fanelli, A. Caprioli.** Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. // *Internat. Journal of Food Microbiol.*, 1999, vol. 49 (1-2), 43-48.
26. **Rippey, S.** Infectious disease associated with molluscan shellfish consumption. // *Clinical Microbiol. Reviews*, 1994, vol. 7, 419-425.
27. **Roldan, M., E. Rodrigues, C. Vicente, M. Navajas, O. Abril.** Microbial contamination of bivalve mollusks used for human consumption. //
28. **Sakurai, J., A. Matsuzaki, T. Miwatani.** Purification and characterisation of thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. // *Infection and Immunity*, 1973, vol.8, 775-780.
29. **Scipioni, A., A. Mauroy, J. Vinje, E. Thiry.** Animal noroviruses. // *The Veterinary Journal*, 2008, vol. 178, 32-45.
30. **Sonier, R., E. Mayrand, A. Boghen, M. Oullettr, V. Mallet.** Concentration of *Escherichia coli* in sediments as an indicator of the sanitary status of oyster (*Crassostrea virginica*) aquaculture sites. // *Journal of Applied Ichthyology*, 2008, vol. 24 (6), 678-684.
31. **Stabili, L., M. Aquaviva, R. Cavallo.** *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). // *Water Research*, 2005, vol. 39, 469-477.

32. **Sulaj, K., D.Telo, Y. Shalari, P. Aleks.** 2006. Monitoring of bacteriological indicators and Salmonella spp. in production zones of bivalve mollusks in Albania on 2004. Ballowis, International scientific conference on water observation and information system for decision support, 23-26 May 2004, Ohrid, Macedonia.
33. **Sulaj, K., K. Korro, S. Duro, P. Zalla, P. Aleks, D. Rapti.** Microbiological pollution of sea wather samples collected from Burini Lagoon in Albania. // *Natura Montenegro*, Podgorica, 2008, vol. 8 (2), 101-105.
34. **Terzi, G., Ö. Büyüktanir, N. Yurdusev.** Detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates in fish and mussels from Middle Black Sea Coast of Turkey. // *Letters in Applied Microbiol.*, 2009, vol. 49 (6), 757-763.
35. **Tood, E.** Epidemiology of foodborne disease: a worldwide review. // *Rapp. Trimest statist. Sanit. Mond*, 1997, vol. 50, 30-50.
36. **Vilariano, M., F. Le Guyader, D. Polo, J. Schaeffer, J. Kröl, J. Romalde.** Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. // *Internat. Microbiol.*, 2009, vol. 12, 145-151.
37. **Yilmaz, I. & B. Bilgin.** Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* and *Venus gallina* harvested from the Marmara Sea. // *Turk. Journal Veter. Anim. Science*, 2005, vol. 29, 409-415.
38. **Yilmaz, H., K. Bostan, N. Turan, K. Muratoglu, A. Yilmaz, A. Ozkul, B. Kocazeybek, Ch. Helps.** Real-time PCR detection of norovirus in mussels collected from the Bosphorus in Istanbul, Turkey. // *Food Environmental Virology*, 2010, vol. 2, 64-68.
39. **Yücel, N. & S. Balci.** Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas* and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. // *Journal of Food Protection*, 2010, vol. 73 (2), 380-384.
40. **Zulkifli, Y., N. Alitheen, R. Son, S. Yeap, M. Lesley, A. Raha.** Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes. // *Internat. Food Research Journal*, 2009, vol. 16, 289-296.