

## Norovirusi u školjkašima kao akutni problem današnjice

I. Škoko, L. Kozačinski, E. Listeš, I. Listeš

### Sažetak

Uzgoj morskih organizama duž jadranske obale ima dugu tradiciju koja datira još iz 19. stoljeća. Hranidbena vrijednost školjaka se temelji na odnosu bjelančevina i masti, uz velike količine glikogena. Osim velike koristi koju organizmi što žive u vodenoj sredini pružaju čovjeku, oni su i realna opasnost za zdravlje. Školjkaši filtriraju velike količine vode da bi se prehranili, te na takav način kumuliraju različite patogene porijeklom iz ljudskog fecesa. Usvajanjem europske regulative (European regulation 91/492/EC) koja propisuje prihvatljive količine bakterijskih patogena, znatno se smanjio utjecaj bakterija na izbijanje gastroenteritisa, ali ne i bolesti izazvane viralnim uzročnicima. Norovirus (NoV, prije „Norwalk-like virus“) predstavlja najvažnijeg uzročnika ne-bakterijskog gastroenteritisa u svijetu. U industrijaliziranom svijetu NoV je moguće odgovoran za preko 80% svih izbijanja gastroenteritisa. NoV spada u porodicu Caliciviridae, a podijeljen je u pet genogrupa (GI-GV), za genogrupe GI, GII i GIV je poznato da izazivaju bolest u ljudi. Nakon infekcije ljudi kontaminiranim školjkašima, epidemija se širi fekalno-oralnim putem, iako do prenosa bolesti može doći i direktnim kontaktom s osobe na osobu, ili viralnim česticama u aerosolu. Iako je bolest uglavnom blaga i samolimitirajuća, može biti i ozbiljna kod pacijenata koji već imaju nekakve zdravstvene smetnje. Četiri su osnovna problema kod detekcije NoV iz školjaka; niski nivo virusne kontaminacije, velika varijabilnost virusa, prisustvo interferirajućih substanci koje inhibiraju molekularnu detekciju i genetska varijabilnost NoV. Dva su koraka uključena kod detekcije enterovirusa iz kontaminiranih školjki, a to je izdvajanje i koncentracija virusa iz hepatopankreasa školjkaša i detekcija virusa uz pomoć reverzne transkripcije (RT) PCR metode. Zbog same strategije procjene rizika potrebno je provesti pretraživanje školjkaša na prisustvo NoV. U Evropi (CEN), je osnovao radnu grupu stručnjaka, za razvoj i validaciju referentne horizontalne metode za detekciju NoV u hrani, uključujući školjkaše.

**Ključne riječi:** školjkaši, norovirus, gastroenteritis

## Summary

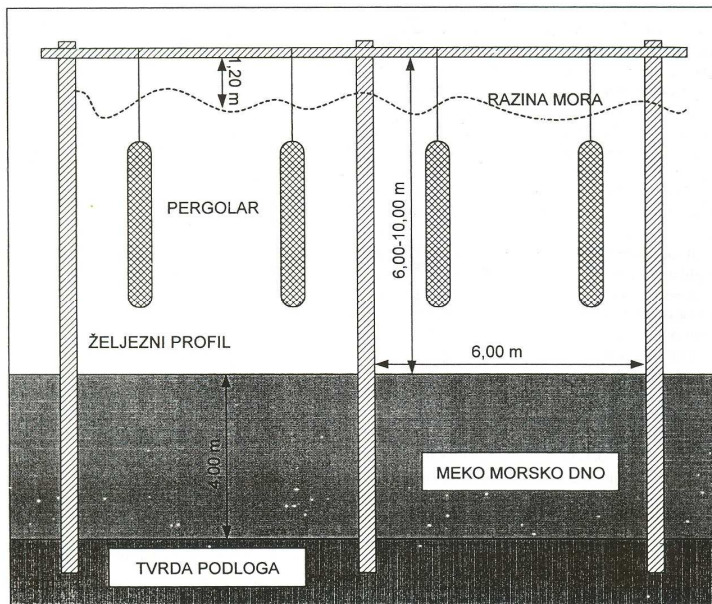
Cultivation of marine organisms has a long tradition, that dates from the 19th century along the Adriatic coast. Value of shellfish is based on the proteins and fat, with large amounts of glycogen. Beside the great value of sea organisms, they are a real danger to human health. Mussels filter large amounts of water to feed, and in that way they bioaccumulate a variety of pathogens, of human faeces origin. The adoption of European regulation (European regulation 91/492/EC), which provides an acceptable amount of bacterial pathogens, the impact of bacteria on the outbreak of gastroenteritis is significantly reduced, but outbreaks caused by viral pathogens are not reduced. Norovirus (NoV, "Norwalk-like virus") is the most important cause of non-bacterial gastroenteritis in the world. In the industrialized world NoV is probably responsible for more than 80% of all gastroenteritis outbreaks. NoV belong to the family Caliciviridae, and is divided into five genogroups (GI-GV) genogroups GI, GII and GIV are known to cause disease in humans. After infection of people with contaminated shellfish, the epidemic is spreading by fecal-oral route, although the disease can get transferred with direct contact from person to person, or by viral particles in aerosol. Gastroenteritis is mostly mild and self-limiting, but it can be serious in patients with some other health problems. There are four basic problems in detection of NoV from shellfish, low levels of viral contamination, high variability of the virus, the presence of substances that inhibit molecular detection and genetic variability of NoV. There are two steps for detection of enteroviruses from contaminated shellfish, first is extraction and concentration of viruses from the shellfish hepatopancreas and detection of viruses by reverse transcription (RT) PCR. Due to the risk assessment strategy, analysing of shellfish for presence of NoV should be implemented. In Europe (CEN), established a working group of experts for the development and validation reference methods for the horizontal detection of NoV in food, including shellfish.

**Key words:** bivalve shellfish, norovirus, gastroenteritis

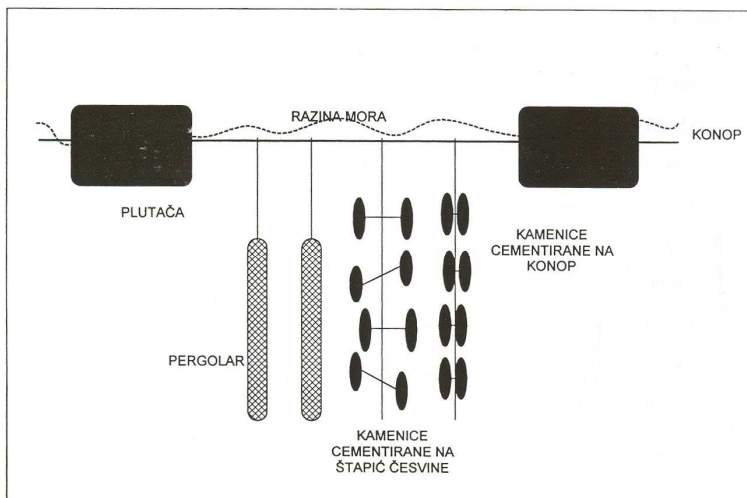
## Uvod

More, odnosno organizmi koji žive u morskoj sredini imaju veliko značenje u prehrani ljudi, napose u današnje vrijeme isticanja važnosti zdrave prehrane. Uzgoj morskih organizama duž jadranske obale ima dugu tradiciju koja datira još iz 19. stoljeća (Skaramuca i sur., 1997). Znanje stečeno dugogodišnjim radom na uzgoju školjkaša i riba, omogućilo je razvoj marikulture, kakva je danas. Od školjkaša se za ljudsku

prehranu prvenstveno uzgajaju dagnje, kamenice, i školjke iz porodice *Aracidae*. Iz prirodnih se staništa najčešće iskorištavaju kunjka *Arca noae*, prnjavica, *Venus verrucosa*, bijela dagnja, *Modiolus barbatus*, kopito *Spondylus gaedoropus*, jakopska kapica, *Pecten jacobaeus* i unatoč zakonskim zabranama, prstac *Litophaga litophaga*, te plemenita periska, *Pinna nobilis* (Bratoš i sur., 2004.). Ishrana školjkaša i njihov rast su ovisni o određenim količinama i vrstama algi, populaciji fitoplanktona, kojima se hrane. Za uspješno uzgajanje školjkaša potrebni su specifični geomorfološki, abiotski i biotski uvjeti sredine. Najprikladniji su veći zaljevi sa suženim ulazom i plići kanali u kojima se vodene mase za vrijeme plime ponovno vraćaju natrag u more, zajedno s larvama školjkaša (Matulić, 2005). Uzgoj školjkaša se može podijeliti u dvije faze. U prvom dijelu života, ličinke školjkaša pripadaju planktonskoj zajednici, dok je odrasla školjka tipični bentosni organizam, tako da je prva faza prikupljanje mladih školjkaša, a druga je uzgoj do konzumne veličine. Količina školjkaša u komercijalnom uzgoju primarno je određena količinom sakupljenog mlađa. Mlađ dagnji se prikuplja rahlo ispletenim konopom postavljenim vodoravno između stupova parkova ili plutača, te se nasađuje u mrežasta najlonska crijeva za uzgoj do konzumne veličine, dok se za prikupljanje mladih kamenica upotrebljavaju snopovi grančica vezanih zajedno najlonskim konopom ili plastičnim pločicama crne, te se prikupljene kamenice nasađuju cementiranjem na konop ili se direktno nasađuju u kutije za uzgoj kamenica. Na kraju 16. mjesečnog ciklusa proizvodnje dagnje narastu do veličine 5- 7 cm, kada su spremne za tržište prema Pravilniku o tržišnim standardima određenih proizvoda ribarstva (N.N. 67/09). Na slici 1. je shematski prikaz fiksnog parka za uzgoj školjkaša, dok se na slici 2. nalazi shematski prikaz plutajućeg parka za uzgoj dagnji i kamenica. Temperatura morske vode važna je za intenzitet ishrane, a ima i značajan utjecaj na spolnu aktivnost. Temperatura tijekom ljeta najmanje 18°C je neophodna za proizvodnju mlađi i za rast školjkaša koji je skoro dva puta brži u predjelima s blagom klimom (Matulić, 2005). Lokacija za uzgoj zakonski se određuje prostornim planovima na temelju biofizičkih karakteristika i kriterija potrebne i podupiruće infrastrukture.



Slika 1. Shema fiksnog parka za uzgoj školjkaša, preuzeto (<http://www.opcina-starigrad.hr/HTML/Uzgoj%20daganja.html>)



Slika 2. Shema plutajućeg parka za uzgoj dagnji i kamenica, preuzeto (<http://www.opcina-starigrad.hr/HTML/Uzgoj%20daganja.html>)

### Patogeni iz školjkaša

Bolesti školjkaša mogu biti uzrokovane različitim uzročnicima (virusi, bakterije, nametnici) te zbog nemogućnosti i/ili neispravnosti liječenja dovode do velikih gubitaka uzgajanih organizama ili mogu u potpunosti uništiti uzgoj na većem području. U Hrvatskoj su bolesti školjkaša i njihovo suzbijanje predmet Zakona o veterinarstvu

(N.N. 41/07), na temelju kojeg se donosi Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini (N.N. 7/10) prema kojoj se školjkaši pretražuju na prisustvo uzročnika martelioze i bonamioze. Osim velike koristi koju organizmi što žive u vodenoj sredini pružaju čovjeku, oni su i realna opasnost za zdravlje ljudi, zbog prenosa bolesti sa školjkaša na ljude i to najčešće slabo termički obrađenim proizvodima ili naknadnom kontaminacijom. Higijenski neispravne za javnu potrošnju su školjke koje su uginule, kojima su ljuštore otvorene, a na dodir se ne zatvaraju, koje potječu iz zagađenih voda, koje nisu dobro očišćene od obraštaja i imaju nesvojstven miris, te koje sadrže biotoksine i koje ne odgovaraju odredbama o količini pesticida i drugih otrovnih tvari, te kontaminirane radionuklidima (Mašić, 2004). Patogeni i drugi mikroorganizmi ulaze u morski okoliš u prvom redu kroz ispuste gradskih otpadnih voda, pa je u većini područja mikrobiološka onečišćenost izravna posljedica ispuštanja nepročišćenih ili djelomično pročišćenih otpadnih voda u more. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2004) od ukupnih otpadnih voda, samo 14% prođe određeni oblik obrade prije ispuštanja (Krstulović i Šolić, 1997). Bivalvne školjke, filtriraju velike količine vode da bi se prehranile, te na takav način bioakumuliraju različite patogene porijeklom iz ljudskog fecesa. Usvajanjem europske regulative (European regulation 91/492/EC) koja propisuje prihvatljive količine bakterijskih patogena, znatno se smanjio utjecaj bakterija na izbijanje gastroenteritisa, ali ne i bolesti izazvane viralnim uzročnicima (Le Guyader i sur., 2009). U Hrvatskoj se svake godine donosi Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša za 2009. godinu (N.N. 31/09), na temelju kojeg se određuju točke monitoringa proizvodnih područja, područja za ponovno polaganje školjkaša, odnosno uzgajališta školjkaša, zatim obuhvaća kontrolu morske vode i mesa školjkaša radi provjere njihove mikrobiološke kvalitete i postojanje biotoksina i štetnih kemijskih tvari u tkivu. Na temelju Pravilnika o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (N.N. 67/09) propisuje se postupak razvrstavanja preliminarnih proizvodnih područja živih školjkaša u mikrobiološke razrede, te sukladno tome se određuje da li školjkaši idu na tržište ili u purifikacijske centre na pročišćavanje, te potom na tržište. Pravilnikom o veterinarsko- zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjaka (N.N. 117/04) se propisuje da otpremni centri i centri za pročišćavanje školjkaša moraju imati i program određivanja vlastitih kritičnih točaka zagađenja, koji se sastoji od sustava analize opasnosti i kontrole kritičnih točaka – HACCP i standardnih sanitacijskih operativnih

postupaka – SSOP. Među najvažnije bakterijske patogene koji dolaze u morskoj vodi, a filtriranjem vode, odnosno hranjenjem školjkaša, se nakupljaju, ubrajaju se rodovi *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, te velik broj streptokoka (Krstulović i Šolić, 1997). U Hrvatskoj su Pravilnikom o higijeni hrane životinjskog podrijetla (N.N. 99/07) određena tri metabolička produkta morskih fitoplanktona/dinoflagelata kojima se školjkaši hrane i koja se bez vidljivih promjena za školjkaše mogu prikupljati u njima, a opasna su za ljudsko zdravlje; Paralytic shellfish poisoning (PSP), Diarrhoeic shellfish poisoning (DSP) i Amnesic shellfish poisoning (ASP). Osim navedenih, u svijetu su poznati i drugi spomenuti u kratkim crtama, kao i ostali oblici otrovanja toksinima fitoplanktonskih algi, odnosno neurotoxic shellfish poisoning (NSP) (Čadež i Teskeredžić, 2005). Uloga školjkaša kao prenosilaca virusa koji uzrokuju bolesti u ljudi dobro je poznata, a epidemiološki je dokazano da se u viruse koje mogu prenijeti školjkaši ubrajaju virus hepatitisa A (HAV) i E, Norovirus (NoV), Snow–Mountagent, astrovirusi, Coxsackie–virusi te mali okrugli virusi (Krstulović i Šolić, 1997). Opasnost se povećava konzumiranjem sirovih ili toplinski nedovoljno obrađenih namirnica, a problem je činjenica da namirnice u većini slučajeva nisu organoleptički promijenjene (Kurtović i sur., 2001). NoV i HAV se trenutno smatraju jednim od najvažnijih patogena iz hrane, u zapadnom svijetu, s obzirom na broj oboljelih i na broj izbijanja bolesti do koje dolazi nakon konzumacije kontaminirane hrane, a nakon infekcije moguće je širenje bolesti i fekalno-oralnim putem (Koopmans i Duizer, 2004). Izbijanja bolesti izazvane na ovaj način uključuju veliki broj ljudi i mogu se proširiti na veće područje. Inkubacija NoV traje 24 do 48 sati, a klinički simptomi bolesti su karakterizirani povraćanjem, u 84,5% slučajeva, vodenim proljevom (53,4% slučajeva), boli u trbuhu (47,6% slučajeva), laganom temperaturom (16,5% slučajeva), glavoboljom i bolovima u mišićima (Prato i sur., 2004). Bolest je uglavnom blagog toka, simptomi prolaze u 2–3 dana, a teži se slučajevi mogu pojaviti u kroničnih bolesnika. Nije uočena razlika u kliničkim simptomima što se tiče spola, dok je znatno veći broj jakih proljeva bio kod starijih osoba, što nije bio slučaj s drugim simptomima (Prato i sur., 2004). Do viralne kontaminacije hrane može doći u svim fazama procesa od farme do stola, pa tako i pri samoj manipulaciji s hranom od strane osoba koje su inficirane, a ta hrana nije nakon manipulacije termički obrađena. Naglasak bi trebao biti na strogoj osobnoj higijeni osoblja tijekom pripreme hrane (Koopmans i Duizer, 2004).

## O Norovirusu

Norovirus (NoV, prije „Norwalk-like virus“) spada u porodicu Caliciviridae, te sačinjava jedan od četiri roda (Rizzo i sur., 2007). NoV je mali okrugli virion, 27- 35nm u promjeru, s jednolančanim pozitivno orijentiranim RNA genomom od 7400- 7700nt. Genom NoV se sastoji od tri „open reading frames“ (ORFs). ORF1 kodira ne strukturalne proteine, uključujući NTPaze, proteaze i RNA-ovisne RNA polimeraze (RdRp). ORF2 kodira najveći kapsidni protein od 58- 60kDA i preklapa 3' kraj ORF1 od 17- 20bp, ovisno o genogrupi. ORF3 kodira najmanji kapsidni protein od 22- 29kDA (Rowena i sur., 2007). NoV je podijeljen u pet genogrupa (GI- GV), ali za GI, GII i GIV je poznato da izazivaju bolest u ljudi, s tim da je GII povezan s akutnim gastroenteritisom u odraslih (Rowena i sur., 2007). Sekvencioniranjem regije kapsidnog gena i u nekim slučajevima spoja ORF1 i ORF2, identificirano je nekoliko rekombinanti NoV. GGIIb virus je izoliran prvi put u Francuskoj 2000, a zatim se proširio po Francuskoj i Evropi tijekom slijedeće zime (Ambert- Balay, 2005). NoV pokazuje različite razine otpornosti prema različitim temperaturama i dezinficijensima, međutim uništava se pri 100°C (Koopmans i Duizer, 2004). Infektivna doza je 7-10 virusnih čestica, izlučivanje virusa u stolici nakon preboljenja je 3-14 dana, što je važno za osobe koje rade s hranom, NoV podnosi relativno visoku koncentraciju klora, do 10ppm klora, podnosi temperaturu zamrzavanja i zagrijavanja do 60°C, što sve olakšava širenje virusa putem vode i hrane (Valić, 2005).

## Epidemiološki podaci

Tipizacija virusa uz pomoć modernih molekularnih metoda je pokazala kako kontaminirana hrana iz jedne države može izazvati izbijanje bolesti u drugoj državi, preko uvezene hrane (Lopman i sur., 2003). NoV predstavlja najvažnijeg uzročnika ne-bakterijskog gastroenteritisa u svijetu. U industrijaliziranom svijetu NoV je moguće odgovoran za preko 80% svih izbijanja gastroenteritisa (Prato i sur., 2004). Kontaminirana hrana ili voda predstavljaju glavni izvor infekcije. NoV se smatra glavnim uzročnikom hranom ili vodom izazvanih gastroenteritisa (Rizzo i sur., 2007). Epidemija se širi dalje fekalno-oralnim putem, iako do prenosa bolesti može doći i direktnim kontaktom s osobe na osobu, ili viralnim česticama u aerosolu (Prato i sur., 2004). Ukoliko su virusi prisutni u hrani i nakon prerade, u većini slučajeva u različitim vrstama hrane, mogu ostati infektivni nekoliko dana ili tjedana, posebno ako se hrana čuva na hladno, pri 4°C (Koopmans i Duizer, 2004). Različiti faktori doprinose visokoj infektivnosti NoV, kao što su niska infektivna doza, odsutnost dugotrajne imunosti,

stabilnost virusa u okolišu, te mogućnost različitog načina prenošenja (Rizzo i sur., 2007). Virus se na hrani ne razmnožava, ali ima izuzetno malu infektivnu dozu, manje od 100 virusnih čestica, a koncentracija virusa u stolici je velika (1g stolice sadrži 1012 virusnih čestica), što objašnjava kako je moguće da u alimentarnim epidemijama veliki broj ljudi oboli u kratko vrijeme (Valić, 2005). Obavijest o izbijanju gastroenteritisa uglavnom dolazi kasno, za izolaciju uzročnika ili za locirati izvor infekcije (Prato i sur., 2004). Izbijanje bolesti uzrokovano NoV može uključiti mnogo ljudi, npr. restorani, turistička mjesta, brodovi, bolnice i škole (Rizzo i sur., 2007). U retrospektivnoj kohortnoj studiji provedenoj u Italiji 2004, izoliran je NoV genogrupe GI i GII u isto vrijeme. U jednom uzorku dagnji utvrđeno je prisustvo obje grupe. Sekvencioniranjem izolata iz 19 slučajeva i 3 uzorka dagnji utvrđena je genogrupa GII, koja odgovara soju NLV/Tarrag/238/2001/Sp, a isti je izoliran i iz školjaka, što je dokaz epidemiološke povezanosti slučajeva i školjaka (Prato i sur., 2004). Iz druga dva slučaja i jednog uzorka dagnji izolirana je genogrupa GI s velikom sličnošću s sojem NLV/Steinbach/EG/2001/CA (Prato i sur., 2004). U drugom slučaju izbijanja bolesti u turističkom mjestu na jugu Italije, 2005, zbog zakašnjelog javljanja bilo je moguće ispitati slučajeve samo tijekom zadnjeg tjedna od izbijanja. Infekcija je naglo izbila i proširila se ljetovalištem (Rizzo i sur., 2007). Najvjerojatnija hipoteza ovog epidemiološkog ispitivanja je da je bolest povezana s sirovim kamenicama i ledom napravljenim od tekuće vode. Ispitani uzorci vode su pokazali visoki nivo koliforma (do 130 cfu/ml) i fekalnih streptokoka (22 cfu/ml), a kako su nakon mikrobiološke analize odbačeni, nije bilo moguće provesti virološko ispitivanje (Rizzo i sur., 2007). Mikrobiološka kontaminacija upućuje da je tekuća voda bila izvor i NoV. Pretpostavlja se da je do širenja bolesti došlo i s osobe na osobu, zbog pojave sekundarnih slučajeva unutar obitelji oboljelih (Rizzo i sur., 2007).

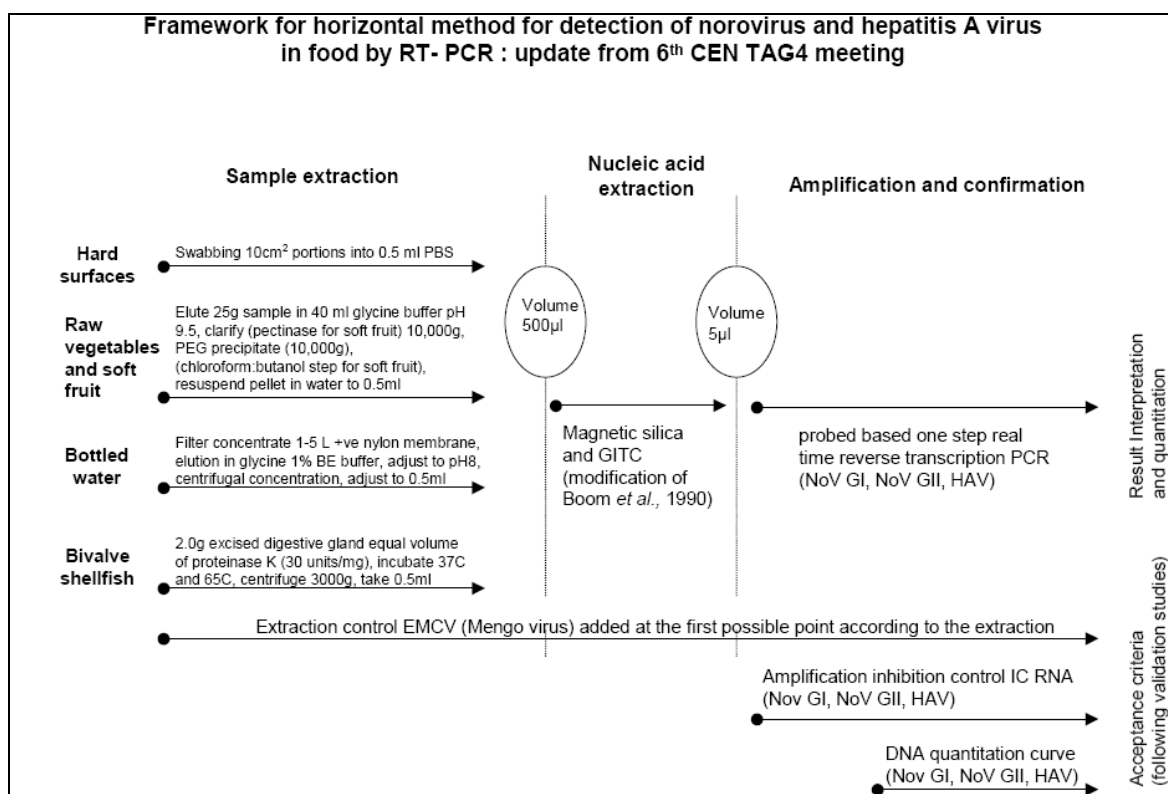
### **Dijagnostika NoV**

Brza i točna dijagnoza je važna kod izbijanja bolesti, kako bi se spriječilo daljnje širenje virusa u populaciji. U zadnjih 15 godina opisano je mnogo metoda za izolaciju patogena iz školjaka. Stare metode detekcije poput elektronske mikroskopije su zamijenjene reverznom transkripcijom RT-PCR i od nedavno imunoenzimskim testovima (Bull i sur., 2006). Imunoenzimni testovi su brži i zahtjevaju manje rada od RT-PCR, ali provedene evaluacije komercijalno dostupnih kitova su pokazale nisku osjetljivost i nemogućnost detekcije svih NoV GII genotipova. Bull i suradnici razvili su metodu nested RT-PCR (nRT-PCR) za detekciju NoV GII. Metoda je korištena za



determinaciju genetičke različitosti cirkulirajućih sojeva u slučajevima gastroenteritisa između 1997 i 2004 (Bull i sur., 2006). Točna dijagnostika viralnih gastroenteritisa je osnovna da bi se spriječilo širenje virusa u populaciji. U Hrvatskoj je 2004 uvedena EIA metoda i radi je Hrvatski zavod za javno zdravstvo – Služba za virologiju, za detekciju kapsidalnog NoV virusnog antigena iz stolice oboljelih ili u povraćanom sadržaju, najbolje iz akutne faze, 48- 72 sata od početka bolesti (Valić, 2005). Moguće je spriječiti daljnje širenje virusa koji su prisutni u zajednici, kod asimptomatskih slučajeva NoV kod pacijenata ili osoblja bolnice, strogim mjerama zaštite od cross-infekcije (Gallimore i sur., 2004). U Sjedinjenim Državama svake godine otprilike 5000 slučajeva smrti se veže uz gastrointestinalne bolesti nepoznate etiologije (Mead i sur., 1999). U Floridi 1995, došlo je do velikog izbijanja gastroenteritisa uzrokovanog konzumacijom kamenica, s tim da je 67% ljudi jelo samo termički obrađene kamenice, ali unatoč tome došlo je do razvoja bolesti isto kao kod ljudi koji su jeli sirove kamenice, tako da se ne može s sigurnošću tvrditi da se kuhanjem moguće zaštititi (McDonnell i sur., 1997). Unatoč odsutnosti tretmana za viralne gastroenteritise, identifikacija uzročnika osobito u slučaju izbijanja bolesti je važna jer omogućuje mjere opreza za spriječavanje daljnjeg širenja uzročnika i bolesti. Bitno je i razlikovanje od bakterijskih ili parazitskih uzročnika jer je kod tih slučajeva tretman moguć (Bull i sur., 2006). Zbog nemogućnosti uzgoja NoV in vitro i zbog njegovog raznolikog genoma, teško je razviti osjetljivu metodu detekcije. Uočeno je da NoV GII-4 dominira kod izbijanja bolesti u bolnicama i sličnim ustanovama, dok je rijedak kao uzročnik gastroenteritisa izazvanih putem kamenica ili vodom, bez obzira što stalno cirkulira u populaciji (Bon i sur., 2005). Poseban problem u tom smislu predstavljaju zatvoreni kolektivi (bolnice, domovi za stare osobe, kampovi, brodovi) gdje epidemija može započeti kao alimentarna zbog zajedničke ekspozicije nekoj fekalno-kontaminiranoj hrani, da bi se kasnije širila kontaktom na ostale članove grupe. Genogrupa GI je detektirana kod većine slučajeva gastroenteritisa izazvanih vanjskim faktorima (Bon i sur., 2005). Genogrupa GI ima više od očekivanog prevalenciju u okolišu, moguće zbog veće otpornosti prema inaktivaciji ili zbog specifičnog vezanja s tkivom kamenica (Le Guyader i sur., 2009). Nekoliko je sojeva virusa pronađeno kod infekcija izazvanih kamenicama ili vodom, dok je samo jedan soj izoliran kod prenosa bolesti s osobe na osobu. NoV GII dominira kod sporadičnih slučajeva pacijenata ispod 15 godina starosti, dok je GI češći kod starijih pacijenata (Bon i sur., 2005). Tijekom 12 mjesječnog istraživanja Nordgren i suradnici (2009), ustvrdili su veću koncentraciju NoV GI u ljetnim mjesecima, a NoV GII u zimskim mjesecima, kako je i bilo za očekivati. Kod detekcije NoV iz školjaka četiri su osnovna

problema; niski nivo virusne kontaminacije, velika varijabilnost virusa, prisustvo interferirajućih substanci koje inhibiraju molekularnu detekciju i genetska varijabilnost NoV (Le Guyader i sur., 2009). Dva su koraka uključena kod detekcije enterovirusa iz kontaminiranih školjki: 1. izdvajanje i koncentracija virusa iz tkiva školjkaša, 2. detekcija virusa uz pomoć RT-PCR metode. Uspješnost PCR-a ovisi o efikasnosti izdvajanja virusa i o uklanjanju inhibirajućih faktora prisutnih u školjkama, što je osobito važno kod niskih nivoa kontaminacije školjkaša (Shieh i sur., 2000). Kod školjkaša najveća koncentracija humanih enterovirusa je uočena u hepatopankreasu, te je upravo zbog toga to ciljno tkivo za pretragu, a prednost je u lakšoj pripremi uzorka, povećanoj osjetljivosti testa i smanjenom interferencijom s RT-PCR (Schwab i sur., 1998). Le Guyader i suradnici (2009) razvili su metodu u kojoj nukleinske kiseline ekstrahiraju uz pomoć Proteinase K, a kao kontrolu efikasnosti ekstrakcije koriste mengovirus, jer je teško moguće da će on prirodno kontaminirati školjkaše, a uzgaja se na kulturama stanica i uspješno se ekstrahira kao i NoV GI i GII (Le Guyader i sur., 2009). U Evropi, European Committee on Normalisation (CEN), je osnovao radnu grupu stručnjaka (CEN/TC 275/WG6/TAG4), na razvoju horizontalne metode za detekciju NoV i HAV u hrani, uključujući školjkaše (Slika 3.).



Slika 3. Horizontalna metoda za detekciju NoV i HAV u hrani RT-PCR, preuzeto ([http://ec.europa.eu/fisheries/dialog/acfa130308\\_annex2\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/fisheries/dialog/acfa130308_annex2_en.pdf))

## Prevenција

S obzirom da je NoV dosta otporan na utjecaje iz okoline, i da se bioakumulira u školjkašima filtracijom, potrebno je naglasak staviti na higijenski ispravnu hranu i vodu, izuzetno je važno i pravilno rukovanje hranom, te često pranje ruku da se spriječi fekalno-oralna kontaminacija hrane. Površine i predmete kontaminirane virusom treba dobro oprati i dezinficirati klornim preparatom. Bilo koja hrana može biti kontaminirana NoV, ali školjkaši su osobito opasni zbog njihove sposobnosti da koncentriraju viruse iz kontaminirane vode. Najvažnija preventivna mjera jest dovoljno dugo kuhanje školjkaša, pri temperaturi od 100°C i sprječavanje konzumiranja sirovih školjkaša. Na taj je način moguće inaktivirati mikroorganizme, te čak i ako se nalaze u školjkašu, ne bi trebalo doći do razvoja bolesti u ljudi.

## Zaključci

Kontaminacija humanim enterovirusima je prepoznata kao vrlo važan rizik vezan uz konzumaciju školjkaša. Procjena rizika se za sada uglavnom zasniva na kontroli školjkaša na prisustvu *E. Coli*, kao indikatoru fekalne kontaminacije. Na temelju Pravilnika o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (N.N. 67/09) propisuje se postupak razvrstavanja preliminarnih proizvodnih područja živih školjkaša u mikrobiološke razrede, te sukladno tome se određuje da li školjkaši idu na tržište ili u purifikacijske centre na pročišćavanje, te potom na tržište. Puštanje školjkaša u prodaju nakon purifikacije može biti problem zbog mogućeg nakupljanja NoV u njima, bez pouzdanih dokaza o eliminaciji samih virusa. Nakon konzumacije kontaminiranih školjkaša, epidemija se širi dalje fekalno-oralnim putem, iako do prenosa bolesti može doći i direktnim kontaktom s osobe na osobu, ili viralnim česticama u aerosolu (Prato i sur., 2004). Potrebno se fokusirati na NoV u školjkašima jer školjkaši mogu služiti kao prenosnici bolesti, kriteriji mikrobiološke kontrole nisu dovoljno validirani da bi bili sigurni u prisustvo ili odsustvo virusa, školjkaši isto tako mogu biti kontaminirani i različitim virusima, te to može dovesti do rekombinacije sojeva NoV u populaciji, također trgovinom školjkašima može doći do širenja novih virusa. Kako školjkaši filtracijom koncentriraju sve viruse tako NoV može biti i indikator prisustva i drugih virusa, produljene inkubacije i kod asimptomatskih slučajeva, koje je teže dijagnosticirati. NoV se smatra glavnim uzročnikom hranom ili vodom izazvanih gastroenteritisa (Rizzo i sur., 2007). Velika je opasnost i zbog toga što se neki školjkaši primjerice kamenice jedu sirove ili slabo termički obrađene, a NoV može biti prisutan u velikoj koncentraciji zbog bioakumulacije. Unatoč odsutnosti tretmana za viralne

gastroenteritise, identifikacija uzročnika osobito u slučaju izbijanja bolesti je važna jer omogućuje mjere opreza za sprječavanje daljnjeg širenja uzročnika i bolesti. NoV prisutni u hrani mogu ostati infektivni nekoliko dana ili tjedana, posebno ako se hrana čuva na hladno, pri 4°C (Koopmans i Duizer, 2004). Smatra se da se dužim kuhanjem uništavaju NoV, primjerice 100°C, dok kratko kuhanje ne uništava NoV, ni temperatura 60°C tijekom 30 minuta (Koopmans i Duizer, 2004). S mrzavanjem također ne uništava NoV, infektivni ostaju i nakon izlaganja pH 2,7 tijekom 3 sata. Dugo preživljavaju i na površinama, a inaktivira ih klor u koncentraciji 10ppm (Valić, 2005). Školjkaši porijeklom iz zone B, mikrobiološki zagađeni, mogu biti stavljeni na tržište nakon procesa purifikacije, međutim purifikacija ne garantira da su školjkaši slobodni i od mogućeg virološkog zagađenja. Da bi smanjili mogućnost prenošenja virusnih bolesti najučinkovitija metoda je smanjenje ili sprečavanje oticanja otpadnih voda u područje uzgoja školjkaša. Za analizu rizika od prisustva NoV u školjkašima, potrebno je provesti ankete o načinu konzumacije i pripreme same hrane, također su potrebni podaci i o prisustvu NoV u školjkašima, detaljne informacije su potrebne i o efikasnom načinu inaktivacije NoV, te je potrebno razviti i način kultivacije NoV in vitro, što bi omogućilo daljnje ispitivanje svojstava NoV. S obzirom na nisku infektivnu dozu NoV potrebno je preispitati i mogućnost stavljanja školjkaša na tržište nakon purifikacije, jer nije provedeno istraživanje za koliko se količina NoV, ako je prisutan, smanji tijekom purifikacije. Potrebno je uspostaviti i referentnu metodu za pretraživanje NoV u školjkašima. Infekcija NoV je tijekom provedenih istraživanja jasno povezana s konzumacijom sirove ili slabo termički obrađene hrane, školjkaša. Iako je bolest uglavnom blaga i samolimitirajuća, također može biti i dosta ozbiljna kod pacijenata koji već imaju nekakve zdravstvene smetnje. Konzumacija školjkaša kontaminiranih s više različitih virusa doprinosi rekombinaciji sojeva NoV. Zbog same strategije procjene rizika potrebno je provesti pretraživanje školjkaša na prisustvo NoV. U Evropi, European Committee on Normalisation (CEN), je osnovao radnu grupu stručnjaka (CEN/TC 275/WG6/TAG4), na razvoju horizontalne metode za detekciju NoV i HAV u hrani, uključujući školjkaše.

### **Literatura**

Ambert-Balay, K., F., Bon, F., Le Guyader, P., Pothier, E., Kohli (2005): Characterization of New Recombinant Noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 43, (10), 5179-5186.

- Bon, F., K., Ambert- Balay, H., Giraudon, J., Kaplon, S., Le Guyader, M., Pommepuy, A., Gallay, V., Vaillant, H., de Valk, R., Chikhi-Brachet, A., Flahaut, P., Pothier, E., Kohli (2005): Molecular Epidemiology of Caliciviruses Detected in Sporadic and Outbreak Cases of Gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J. Clin. Microbiol.* 43, (9), 4659- 4664.
- Bratoš, Ana, B., Glamuzina, A., Benović (2004): Hrvatsko školjkarstvo-prednosti i ograničenja. *Naše more*, 51, (1-2), 59-62.
- Bull, Rowena A., Elise T.V., Tu, C.J., McIver, W.D., Rawlinson, P.A., White (2006): Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis., *J. Clin. Microbiol.* 44, (2), 327- 333.
- Bull, Rowena A., M.M., Tanaka, P.A., White (2007): Norovirus recombination. *J. Gen. Virol.* 88, 3347-3359.
- CDC, (2001): Norwalk-like viruses – Public health consequences and outbreak management. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 2001, 50, 1-18.
- Čadež, Vida, E. Teskeredžić (2005): Patogeni mikroorganizmi i toksini koje prenose školjkaši iz onečišćenih područja — zoonoze. *Ribarstvo*, 63, (4), 135-145.
- Gallimore, C.I., D., Cubitt, Nelita, du Plessis, J.J., Gray (2004): Asymptomatic and Symptomatic Excretion of Noroviruses during a hospital outbreak of Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 42, (5), 2271- 2274.
- Koopmans, M., E., Duizer (2004): Foodborne viruses; an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.*, 90, (1), 23- 41.
- Krstulović, N., M., Šolić (1997): Mikrobiološko zagađenje mora. *Hrvatska vodoprivreda*, VI, (55), 31–35.
- Kurtović, B., E. Teskeredžić (2001): Zoonoze organizama koji žive u vodi. *Ribarstvo*, 59, (4), 159-169.
- Le Guyader, Françoise, S., Sylvain, Parnaudeau, Julien, Schaeffer, A., Bosch, F., Loisy, Monique, Pommepuy, R.L., Atmar, (2009): Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, (3), 618-624.
- Lopman, B.A., M.H., Reacher, Y., Van Duynhoven, F.X., Hanon, D., Brown, M., Koopmans (2003): Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9, (1), 90-96.
- Mašić, M., (2004): Higijena i tehnologija prerade školjaka. *Meso*, VI, (4), 40-45.
- McDonnell, S., K.B., Kirkland, W.G., Hlady, C., Aristeguieta, R.S., Hopkins, S.S., Monroe, R.I., Glass (1997): Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis. *Arch. Intern. Med.* 157,(1), 111-116.

Mead, P.S., L., Slutsker, V., Dietz, L.F., McCaig, J.S., Bresee, C., Shapiro, P.M., Griffin, R.V., Tauxe (1999): Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607- 625.

Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini (N.N. 7/10).

Nordgren, J., A., Matussek, Ann, Mattsson, L., Svensson, P.E., Lindgren (2009); Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water research*, 43, 1117–1125.

Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša za 2009. godinu (N.N. RH 31/09).

Prato, Rosa, P.L., Lopalco, Maria, Chirona, Giovanna, Barbuti, Cinzia, Germinario, Michele, Quarto (2004): Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infectious diseases*, 4, (37), 1471-2334.

Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (N.N. RH 99/07).

Pravilnik o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (N.N. RH 67/09).

Pravilnik o tržišnim standardima određenih proizvoda ribarstva (N.N. RH 67/09).

Pravilnik o veterinarsko- zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćivanje i stavljanje u promet živih školjaka (N.N. RH 117/04).

Rizzo, Caterina, Ilaria, Di Bartolo, Marilina, Santantonio, Maria, Francesca, Coscia, Rosa, Monno, Danila, De Vito, F.M., Ruggeri, G., Rizzo (2007): Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infectious diseases*, 7, (135), 1471- 2334.

Schwab, K.J., F.H., Neill, M.K., Estes, T.G., Metcalf, R.L., Atmar (1998): Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.*, 61, 1674-1680.

Shieh, Carol, S.S., Monroe, R.L., Fankhauser, G.W., Langlois, W., Burkhardt, R.S., Baric (2000): Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J. Infect. Dis.*, 181,(2), 360-366.

Skaramuca, B., Zlatica, Teskeredžić, E., Teskeredžić (1997): Mariculture in Croatia, history and perspectives. *Ribarstvo*, 55, (1), 19-26.

URL: [http://ec.europa.eu/fisheries/dialog/acfa130308\\_annex2\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/fisheries/dialog/acfa130308_annex2_en.pdf)

URL: <http://www.opcina-starigrad.hr/HTML/Uzgoj%20daganja.html>

Valić, Jasna (2005): Norwalk- like virusi – uzročnici na koje treba misliti. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 1, (3).

WHO (2004): Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper 80. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome  
Zakon o veterinarstvu (N.N. RH 41/07).