

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla



Nevena N. Ilić, DVM

**IDENTIFIKACIJA I FILOGENETSKA
ANALIZA NOROVIRUSA POREKLOM IZ
DAGNJI (*Mytilus galloprovincialis*) SA
ASPEKTA BEZBEDNOSTI HRANE**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of food hygiene and technology



Nevena N. Ilić, DVM

**IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC
ANALYSIS OF NOROVIRUS DETECTED
IN MUSSELS (*Mytilus galloprovincialis*)
FROM THE ASPECT OF FOOD SAFETY**

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2017.

MENTORI

Dr Mirjana Dimitrijević, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Branko Velebit, viši naučni saradnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Nedeljko Karabasil, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Dejan Vidanović, naučni saradnik,

Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“

Datum odbrane: _____

Veliku zahvalnost za pomoć pri izradi ove disertacije dugujem svojim kolegama, nastavnicima i saradnicima Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, čast je biti deo vas.

Hvala kolektivu Instituta za higijenu i tehnologiju mesa iz Beograda, Specijalističkoj veterinarskoj laboratoriji iz Podgorice, kao i Institutu za biologiju mora iz Kotora, bez čije stručne pomoći i velikog angažovanja ova disertacija ne bi bila uspešno realizovana.

Posebno se zahvaljujem svojim mentorima. Profesorki dr Mirjani Dimitrijević na podršci, razumevanju, savetima i posvećenom vremenu koje mi je pružila. Dr Branku Velebitu koji mi je na samom početku otvorio laboratorijska vrata i uveo u svet molekularne biologije, hvala na poverenju, znanju i iskustvu koje mi je preneo.

Veliko hvala profesoru dr Vladi Teodoroviću na svakom stručnom, ali i životnom savetu, profesoru dr Neđeljku Karabasilu i dr Dejanu Vidanoviću za svu ljudsku i profesionalnu pažnju. Hvala profesoru Milanu Ž. Baltiću za nesebičnu podršku i preneseno znanje.

Zahvaljujem se mojim prijateljima, koji su bili moja emocionalna podrška i oslonac.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici. Mojim roditeljima i sestri na bezgraničnoj ljubavi i ostvarenim snovima, Vladimiru na beskrajnoj pažnji i ogromnom strpljenju i maloj Sari na najslađim osmesima uz koje je sve bilo lakše.

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru projekta „Odabrane biološke opasnosti za bezbednost/kvalitet hrane animalnog porekla i kontrolne mere od farme do potrošaca” (Ev. br. TR 31034) i projekta “Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu” (Ev. Br. III 46009). Ove projekte finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

IDENTIFIKACIJA I FILOGENETSKA ANALIZA NOROVIRUSA POREKLOM IZ DAGNJI (*Mytilus galloprovincialis*) SA ASPEKTA BEZBEDNOSTI HRANE

REZIME

Virusi koji se prenose hranom predstavljaju sve veći problem sa aspekta bezbednosti hrane i javnog zdravlja ljudi. Norovirus je jedan od vodećih uzročnika epidemijskih i sporadičnih slučajeva gastroenteritisa u svetu. Imajući u vidu da ne postoje relevantni podaci o prevalenci ovog virusa u dagnjama dostupnih na tržištu u našoj zemlji, koje dolaze iz crnogorskog akvatorijuma i da je metoda za njihovu detekciju na samom početku razvoja, cilj ove doktorske disertacije je da se primenom molekularno-bioloških tehnika utvrdi prisustvo, da se izvrši identifikacija i genotipizacija norovirusa u dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*), ispita korelacija sa brojem *E.coli* u dagnjama i brojem mikroorganizama u morskoj vodi i proveriti uticaj fizičko-hemijskih i bioloških parametara na pojavu norovirusa.

Ukupno su ispitana 72 kompozitna uzorka, dobijena od oko 1000 komada dagnji. Ispitivanje je rađeno na dagnjama sakupljanim u jednogodišnjem periodu (od jula 2015. do jula 2016. god.) sa 6 različitih lokacija iz registrovanih uzgajališta u Crnoj Gori. Uzorci su ispitivani metodom Real Time RT-PCR na prisustvo GI i GII genogrupe norovirusa. Efikasnost ekstrakcije svih uzoraka bila je zadovoljavajuća. Norovirus je utvrđen u 31 uzorku (43%), sa znatno većim brojem GII pozitivnih uzoraka (54,8%) nego GI (12,9 %), dok je kod 10 (32,3%) uzoraka utvrđeno istovremeno prisustvo norovirusa obe genogrupe (GI+GII).

Metodom genotipizacije utvrđeno je da su svi detektovani norovirusi genogrupe GI pripadali genotipu GI.2, dok je većina detektovanih norovirusa genogrupe GII pripadala genotipu GII.4, izuzev jednog koji je pripadao genotipu GII.2. Rezultati filogenetske analize ukazuju na genetsku sličnost između norovirusa izolovanih u okviru ove disertacije i onih ranije opisanih u svetu. Na osnovu nukleotidne sekvence ispitnog ORF2 fragmenta sojeva NOV_GI_MNE 1, 2, 3, 4 utvrđena je sličnost od

98,1% do 99,2% sa izolatom Southampton virusa (L07418), a za nukleotidne sekvence ispitanog ORF2 fragmenta sojeva NOV_GII_MNE 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 22, 24 utvrđena je sličnost od 96,4% do 98,5% sa izolatom Hu/GII.4/sydney/NSW05 (JX459908), trenutno najrasprostranjenijem cirkulirajućem epidemijskim sojem.

Ustanovljena je sezonska varijacija prisustva NoV u dagnjama. Najveći broj pozitivnih uzoraka zabeležen je tokom zimskih meseci, odnosno u decembru, januaru i februaru, dok je najmanji broj pozitivnih uzoraka detektovan u letnjem periodu. Statističkom analizom ustanovljeno je da se sa smanjenjem temperature mora, statistički značajno povećava pojava virusa, dok ostali fizičko-hemijski parametri morske vode (pH, salinitet, zasićenost kiseonikom) nisu statistički značajno uticali na pojavu virusa u dagnjama. Utvrđeno je da broj *E.coli* u dagnjama nije u korelaciji sa pojavom norovirusa u njma. Godišnja varijacija bujnosti fitoplanktonske komponente i koncentracije hlorofila *a* nije imala statistički značajan uticaj na pojavu virusa u dagnjama. Nije ustanovljena ni statistički značajna korelacija između mikrobioloških parametara morske vode i pojave virusa u dagnjama.

Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije ukazuju na potencijalni rizik od pojave virusnih bolesti prenosivih hranom i na potrebu uspostavljanja plana monitoringa prisustva norovirusa u dagnjama, u cilju poboljšanja javnog zdravlja.

Ključne reči: norovirus, dagnje, Real Time RT-PCR, bezbednost hrane

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

UDK broj: 619 : 637.07 : 578.835.3

IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NOROVIRUS DETECTED IN MUSSELS (*Mytilus galloprovincialis*) FROM THE ASPECT OF FOOD SAFETY

SUMMARY

In terms of food safety and public health, foodborne viruses represent an increasing problem. Norovirus is one of the leading causes of epidemic and sporadic cases of gastroenteritis worldwide. Bearing in mind that there are no relevant data on the prevalence of this virus in mussels, available on the market in our country that come from the Montenegrin aquatorium and that the method for their detection is at the very beginning of development. Therefore, the aim of this dissertation was to determine presence, to identify and genotype norovirus in mussels (*Mytilus provincialis*), to examine the correlation between the presence of the virus and the amount of *E. coli* in mussels; and to determine the influence of physico-chemical factors on virus infections by molecular genetic techniques.

Seventy two samples, obtained from about 1000 mussels, were analyzed with satisfactory efficiency of the extraction. The examination was performed on the mussels collected in a one-year period (between July 2015 and July 2016), on six different locations. The samples were examined for the presence of GI and GII virus genotypes, using Real Time RT-PCR method. Norovirus was found in 31 samples (43%) with significantly higher number of GII positive samples (54,8%) than GI positive samples (12,9%). The presence of norovirus of both genogroups (GI + GII) was determined in 10 (32.3%) of the samples. Analyzes of the genotypes showed that all GI positive samples ascribed to genotypes GI.2, 12 GII positive samples ascribed to genotypes GII.4, while 1 GII sample ascribed to genotypes GII.2. The results of phylogenetic analysis showed the genetic link between our isolates and those previously described in other studies. Genotyping was based on the partial ORF2 sequences: NOV_GI_MNE 1, 2, 3, 4 we found 98,1% and 99,2% similarity with Southampton virus (L07418), and for ORF2 sequences NOV_GII_MNE 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 22, 24 we found 96,4%

do 98,5% similarity with Hu/GII.4/sydney/NSW05 (JX459908). Two shellfish samples ascribed as genotype II.4 showed Hu/GII.4/sydney/NSW05, Currently the most widespread circulating epidemic strain.

Seasonal variation of the NoV level was observed. The highest numbers of positive samples were detected during the winter months, in December, January and February, while the smallest numbers of positive samples were detected in the summer period. Statistical analysis showed that virus presence statistically significantly increased with the reduction of sea temperature, while other physical and chemical parameters of the sea water (pH, salinity, oxygen saturation) did not have significant statistical significance for the appearance of viruses in mussels. Other physico-chemical factors were not of great significance for the appearance of norovirus infections. It was found that the number of *E.coli* CFU/g in mussels was not correlated with the occurrence of norovirus. Variation of phytoplankton and concentration of chlorophyll *a* did not have a statistically significant effect on the appearance of viruses in the mussels. There was no statistically significant correlation between the microbiological parameters of seawater and the appearance of viruses in the mussels.

The results of the research from this dissertation pointed out the potential risk of the occurrence of foodborne viral diseases and the need to establish a monitoring plan for the presence of norovirus in mussels in order to improve public health.

Key words: norovirus, mussels, Real-Time RT-PCR, food safety

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Meat Hygiene and Technology

UDC Number: 619 : 637.07 : 578.835.3

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. PREGLED LITERATURE	6
2.1. Istorija otkrića norovirusa.....	6
2.2. Klasifikacija i struktura norovirusa.....	7
2.2.1. Organizacija genoma.....	9
2.2.2. Replikacija virusa.....	11
2.3. Epidemiološki podaci.....	13
2.4. Patogeneza norovirusa.....	14
2.4.1. Klinička slika.....	18
2.5. Dagnje kao izvor virusne infekcije.....	18
2.6. Uticaj fizičko-hemijskih parametara na otpornost norovirusa.....	21
2.7. Bioindikator virusne kontaminacije.....	24
2.7.1. Bakterije indikatori fekalnog zagađenja.....	24
2.7.2. Bakteriofagi.....	26
2.7.3. Fitoplankton.....	27
2.8. Dijagnostika norovirusa.....	27
2.9. Lečenje i prevencija norovirusne infekcije.....	32
2.10. Preventivne i kontrolne mere.....	33
3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA	34
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	36
4.1. Prikupljanje uzoraka.....	36
4.1.1. Lokacije za prikupljanje uzoraka.....	36
4.2. Priprema materijala za izolaciju virusne RNK.....	38
4.3. Molekularne metode ispitivanja.....	40

4.3.1. Ekstrakcija virusa.....	40
4.3.2. Prečišćavanje virusne RNA.....	41
4.3.3. Amplifikacija virusne RNK primenom Real-Time RT-PCR metode.....	43
4.3.4. Procesni kontrolni materijal.....	44
4.4. Sekvenciranje dela genoma.....	45
4.4.1. Filogenetska srodnost.....	48
4.5. Fizičko-hemijske analize morske vode.....	48
4.6. Mikrobiološki parametri morske vode.....	49
4.7. Kvantitativna i kvalitativna analiza fitoplanktonske komponente.....	50
4.8. Broj <i>E.coli</i> u dagnjama.....	51
4.9. Statistička obrada rezultata.....	51
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	53
5.1. Prisustvo i zastupljenost norovirusa.....	53
5.2. Rezultati dokazivanja virusne RNK Real Time RT- PCR metodom	54
5.3. Genetska identifikacija i filogenetska analiza NoV poreklom iz dagnji.....	56
5.4. Rezultati fizičko-hemijskih parametra morske vode.....	61
5.5. Broj pozitivnih uzoraka po mesecima.....	65
5.6. Korelacija između pojave NoV i mikrob. parametara morske vode.....	66
5.7. Fitoplankton kao bioindikator.....	68
5.7.1. <i>Hlorofil a</i>	69
5.8. Pojava NoV i njegova korelacija sa brojem <i>E.coli</i> u dagnjama.....	70
6. DISKUSIJA.....	74
7. ZAKLJUČCI.....	87
8. SPISAK LITERATURE.....	89

1. UVOD

Namirnice koje se koriste u ishrani ljudi mogu biti izvor širokog spektra uzročnika oboljenja prenosivih hranom i njihova konzumacija može predstavljati rizik po zdravlje potrošača.

Virusi koji se prenose hranom predstavljaju sve veći problem sa aspekta bezbednosti hrane i javnog zdravlja ljudi. Prema poslednjem izveštaju iz 2015. godine (EFSA-*European Food Safety Authority*), okarakterisani su kao najčešći uzročnik epidemija koje se prenose hranom. Oni su veoma su rasprostranjeni ultramikroskopski organizmi. Nalaze se svuda: u vodi, vazduhu, zemljištu, kao kontaminanti hrane i vode za piće i izazivači su velikog broja oboljenja biljaka, životinja i ljudi. Virusni sadržaji sadrže samo jednu nukleinsku kiselinu i po tome su jedinstveni organizmi. Iako je njihova građa proučena do detalja, terapija virusnih bolesti se obično ne primenjuje, a broj antivirusnih lekova je mali i skopčan sa brojnim neželjenim efektima.

O ulozi hrane u prenošenju virusa, kao uzročnika alimentarnih oboljenja, zna se manje nego u slučaju bakterija. Jedan od razloga je, što se o virusima, kao mogućim uzročnicima oboljenja, razmišlja tek kada se bakterijska oboljenja isključe. Drugi razlog je teška izolacija virusa iz matriksa hrane, pošto su oni po strukturi međusobno različiti, pa zahtevaju i različite tehnike ekstrakcije i obrade materijala.

Virusi koji se najčešće javljaju, a prenose se hranom su norovirus i hepatitis A, ali i drugi virusi kao što su rotavirus, hepatitis E, astrovirus, sapovirus, enterovirus i dr. Na osnovu simptoma koji se javljaju nakon infekcije, ovi virusi se mogu grupisati u one koji izazivaju gastroenteritise, zatim hepatitise i treću grupu čine virusi koji se umnožavaju u digestivnom traktu ljudi, a izazivaju oboljenje kada migriraju u druge organe, kao što je centralni nervni sistem.

Specifične karakteristike virusa koji se prenose hranom, zbog kojih oni predstavljaju nove izazove u oblasti upravljanja rizikom su sledeće:

- Virusima je potrebna živa ćelija da bi mogli da se umnožavaju, tako da se za razliku od bakterija, oni u hrani ne mogu razmnožavati. Shodno tome, virusi nikada neće dovesti do organoleptičkih promena namirnice.
- Veoma su infektivni, samo nekoliko virusnih čestica/partikula (1-100) je dovoljno da bi se izazvala infekcija (*Morillo, 2011*).
- Veliki broj virusnih čestica se izlučuje fecesom inficiranih ljudi (10^8 - 10^{11} virusnih partikula kod ljudi sa ispoljenim kliničkim simptomima) (*Lee, 2007*).
- Ovi virusi uglavnom nemaju omotač i pokazuju veliku otpornost u spoljašnjoj sredini.

Većina virusa koji se prenose hranom poreklom su iz ljudskog fekalnog materijala. Hrana može biti primarno kontaminirana virusom, ili naknadno tokom čitavog lanca proizvodnje. Globalizacija u prometu hrane utiče na to da se izvor i kvalitet svežih proizvoda ne može uvek prepoznati i kontrolisati. Iako se pretpostavlja da je sveža hrana higijenski ispravna, to ne mora uvek biti slučaj, posebno kada se uvozi iz zemalja u kojima kriterijumi opšte higijene ne ispunjavaju međunarodne standarde.

Norovirus je glavni izazivač nebakterijskog akutnog gastroenteritisa koji se javlja širom sveta i u svim starosnim grupama. U industrijalizovanom svetu, ovaj virus odgovoran je za 68-80% svih slučajeva gastroenteritisa (*Ahmed i sar., 2014*).

Školjke kao organizmi koji se hrane filtriranjem morske vode, mogu koncentrisati viruse koji se nalaze u oblastima u kojima rastu, pa postaju sa stanovišta bezbednosti hrane rizična namirnica, naročito ako se jedu sirove ili nedovoljno termički obrađene (*Alfano-Sobsey i sar., 2012*). Nakon izbijanja gastroenteritisa izazvanog konzumacijom kontaminiranih dagnji, epidemija može dalje da se širi fekalno-oralnim putem, ali i direktnim kontaktom sa osobe na osobu, aerosolom itd. (*Prato i sar., 2004*).

Sanitarna kontrola dagnji ne zahteva detekciju bilo kog virusa i u skladu sa propisima Evropske Unije (**Reg.EC 854/2004**) zasniva se na detekciji bakterijskih indikatora, kao što je *Escherichia coli*. Nekoliko studija pokazalo je da broj bakterija ponekad nije u korelaciji sa nivoom virusne kontaminacije, jer virusi imaju veću otpornost u životnoj sredini i otporniji su tokom postupka prečišćavanja dagnji (*Polo i sar., 2010*).

Jedna od osnovnih karakteristika norovirusa je da se ne mogu umnožavati u kulturama ćelija. Jedini način njegove detekcije i identifikacije je primena savremenih molekularnih metoda kao što su *Reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR i Real-Time RT-PCR (*Le Guyader i sar., 2003*).

Virusi koji se prenose hranom predstavljaju složeni problem, pa je kvalitetna saradnja i koordinacija zdravstvenih i veterinarskih ustanova, koje su uključene u proces nadzora i proizvodnje zdravstveno bezbednih namirnica, jedan od ključnih elemenata u povezivanju zdravlja ljudi i životinja. Primena veoma aktuelnog aspekta *jedan svet-jedno zdravlje (one health, eng.)* kod virusa prenosivih hranom značajno dolazi do izražaja.

S obzirom na navedene podatke, cilj ove disertacije bio je da se ispita prisustvo norovirusa u dagnjama, uticaj parametara životne sredine na njegovu pojavu, kao i da se filogenetskom analizom odredi položaj norovirusa dokazanih u dagnjama iz crnogorskog akvatorijuma na svetskom filogenetskom stablu, imajući u vidu da ovakva istraživanja nisu rađena za ovaj deo jadranske obale. U toku rada posebna pažnja je posvećena uzorkovanju i pripremi uzoraka za analizu, što može doprineti uvođenju plana monitoringa virusa u dagnjama.

2. PREGLED LITERATURE

U pregledu literature prikazana su dosadašnja naučna saznanja o klasifikaciji i taksonomiji, građi virusnog genoma, epidemiologiji, patogenezi, kliničkim simptomima, dijagnostici, terapiji i prevenciji pojave infekcija izazvanih norovirusom. Osim postojećih podataka o metodama koje su se nekada koristile, poseban akcenat stavljen je na savremene molekularne metode koje predstavljaju napredak i prekretnicu u razvoju virusološke dijagnostike.

2.1. Istorija otkrića Norovirusa

Prvi slučaj oboljenja izazvanog norovirusom, koji tada nije bio poznat po tim imenom, opisao je pedijatar dr **J. Zahorsky** (1929) u svom izveštaju o sporadičnim slučajevima povraćanja i proliva, koje je primetio među svojim pacijentima u St Louis-u, a koji su se tipično pojavljivali tokom hladnijih meseci, odnosno od novembra do maja. O ovoj bolesti napisao je obimnu studiju u kojoj je podvukao značaj dobre higijenske prakse kao osnovu za sprečavanje širenja bolesti, a virusu dao naziv: „zimski bolest povraćanja“.

Prvobitno nazvan Norwalk virus, kasnije preimenovan u „virus male okrugle strukture“, otkrili su **Kapikian i sar.** (1972.) iz uzorka stolice, odnosno rektalnog brisa bolesne osobe, koja je bila zahvaćena epidemijom gastroenteritisa, a dogodila se 1968.godine, u osnovnoj školi u Norwalku (Ohajo, SAD). U to vreme, svaki slučaj gastroenteritisa koji nije bio bakterijski nazivan je akutni nebakterijski gastroenteritis. Pripremljen je filtrat (potvrđeno slobodan od bakterija) i ispitan na dobrovoljcima. Dva od tri ispitanika razvila su simptome identične onim iz vremena epidemije u Norwalk-u. Uzorci stolice dobrovoljaca (Slika 1.) ispitani su tehnikom imune elektronske mikroskopije (IEM), koja uključuje posmatranje stvaranja kompleksa antigen-antitelo elektronskim mikroskopom (*Anderson i Stanley, 1941; Kapikian i sar., 1972.*). Nakon te epidemije, bilo je prijavljeno još nekoliko slučajeva, posebno na brodovima za krstarenje. Dve najveće epidemije bile su na kruzerima Queen Elizabeth 2nd Cruise Ship i Royal Caribbean's Freedom of the Seas, gde je epidemijom bilo zahvaćeno i više od

300 putnika i članova posade, posle čega je **Appleton** 1977. godine prvi put uveo ime Norovirus.

U literaturi se ovaj virus pominje i pod drugim imenima: Norwalk virus, Norwalk-like virus (NLVs), Norwalk agent, mali virus zaobljene structure (SRSVs), Snow Mountain virus, akutni nebakterijski gastroenteritis, virusni gastroenteritis, stomačni grip.

Međunarodni komitet za taksonomiju virusa (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) je na sednici održanoj 2002. godine usvojio naziv Norovirus.



Slika 1. Norovirusne čestice posmatrane pod elektronskim mikroskopom (*Kapikian i sar., 1972*)

2.2. Klasifikacija i struktura norovirusa

Razvojem molekularnih dijagnostičkih metoda početkom 90-ih godina, pojavile su se i prve studije koje su na osnovu redosleda nukleotida, odnosno nukleinskih kiselina, u potpunosti opisale strukturu norovirusa.

Norovirus (NoV, ranije nazivan „Norwalk-like virus“) je mali okrugli virion, sa jednolančanim pozitivno orijentisanim RNK genomom (+ssRNA) bez omotača. Karakteristika ove grupe virusa je udubljenje na površini u obliku čašice (calix-a), nazvano „Davidova zvezda“ (*Lees, 2000; Green, 2007*).

Norovirus spada u familiju *Caliciviridae*, i sačinjava jedan od pet rodova (*Jiang i sar., 1990*). Ostali rodovi pripadnici porodice *Caliciviridae* su: lagovirus, nebovirus, vesivirus i sapovirus. *Caliciviruses* kod ljudi (HuCV) čine norovirus i sapovirus koji se razlikuju na osnovu morfoloških i genetskih karakteristika, a preostali pripadnici ove porodice virusa inficiraju životinje (*Thorn i Goodfellow, 2014*).

Pored Norwalk virus-a, rod Norovirus čine i sledeće vrste: Desert Shield virus, Hawaii virus, Lordsdale virus, Mexico virus, Snow Mountain virus i Southampton virus, kao i neke specifične vrste kao što su goveđi norovirus – CH126, goveđi norovirus – Jena, ljudski norovirus – Alphanoron, mišji norovirus 1 i svinjski norovirus (*Fauquet i sar., 2005*).

Genom virusa dugačak je 7500 do 7700 nukleotida, odnosno 27 do 40 nm. Virus je sastavljen od velikog strukturnog proteina - VP1 (90 dimera), sa karakterističnom konstrukcijom na površini u vidu 32 udubljenja u obliku čaše koji čini kapsid i jednog ili dva manja proteina - VP2.

VP1 protein čini 530-555 amino kiselina i težak je oko 58-60 kDa. Postoji 180 kopija ovog proteina, a zajedno čine T=3 virion. Protein čine dva domena: S i P, domen ljuske koji se nalazi na N-terminalnom završetku (čini ga 225 amino kiselina) i istureni domen koji je podeljen u dva pod-domena P1 i P2. Istureni domeni se tako nazivaju jer se elektronskom mikroskopijom vide kao izbočine na virionu i daju mu dodatnu stabilnost (*Prasad i sar., 1999*). Hipervarijabilni P2 domen ima značajnu ulogu u vezivanju virusa za receptor i imunskom odgovoru i odgovoran je za interakciju sa ABO sistemom krvnih grupa i njihovom osetljivošću na norovirusnu infekciju (*Hardy, 2005*).

VP2 protein sastoji se od 208-268 amino kiselina, težine je oko 22-29 kDa i pokazuje visoku varijabilnost između različitih sojeva (*Seah i sar., 1999*). Prisutan je u jednoj ili dve kopije u virionu, njegova uloga u ciklusu replikacije još uvek nije dovoljno poznata, ali se smatra da učestvuje u pakovanju RNK genoma.

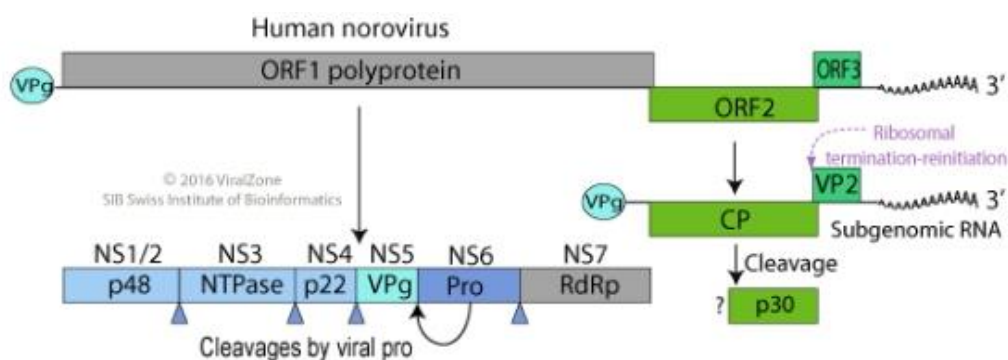
Virion norovirusa sadrži i 6 nestrukturnih proteina koji nastaju delovanjem viralne proteinaze od nestrukturnih poliproteina (*Hardy, 2005*).

2.2.1. Organizacija genoma

Genom norovirusa organizovan je u tri glavna, konzervativna *Open Reading Frame* (ORFs) regiona, sa izuzetkom mišjeg norovirusa (MNV) koji poseduje i četvrti ORF (*Jiang i sar., 1992; Atmar, 2010; Thorn i Goodfellow, 2014*).

ORF1 nalazi se na 5' kraju i kodira veliki poliprotein koji se nakon translacije cepa u 6 nestrukturnih proteina koji će biti uključeni u replikaciju: N-terminalni protein (p48), NTP-aze, p22 (3A), VPg, viralna proteaza (3C), RNK zavisna RNK polimeraza (RdRp) (Slika 2.). **ORF2** kodira glavni strukturni protein (VP1) koji u 180 kopija po virionu gradi kapsid, a **ORF3** kodira manji strukturni protein (VP2) i javlja se u samo nekoliko kopija. **ORF2** se sa 14 amino kiselina preklapa sa **ORF1** i sa jednom amino kiselinom sa **ORF3** (*Green, 2007*).

Target regioni nazvani su: region A (RdRp lokalizovan u ORF1), region B (3' kraj ORF1), region C (u blizini 5' kraja ORF2 regiona) i region D (lokalizovan u blizini 3' kraja ORF2 regiona).



Slika 2. Prikaz norovirusnog genoma (<http://ncbi.nih.gov/>)

Sekvenciranjem regije gena za sintezu kapsida i u nekim slučajevima spoja ORF1 i ORF2, identifikovano je nekoliko rekombinantnih sojeva NoV (*Bull i sar., 2007*). Genotipizacija bazirana samo na kapsidnoj regiji ne bi bila dosledna zbog rekombinacije NoV, naročito jer je mesto rekombinacije u samoj blizini te regije (*Bull i*

sar., 2005). Genotipizacija se obavlja korišćenjem internet alata (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>).

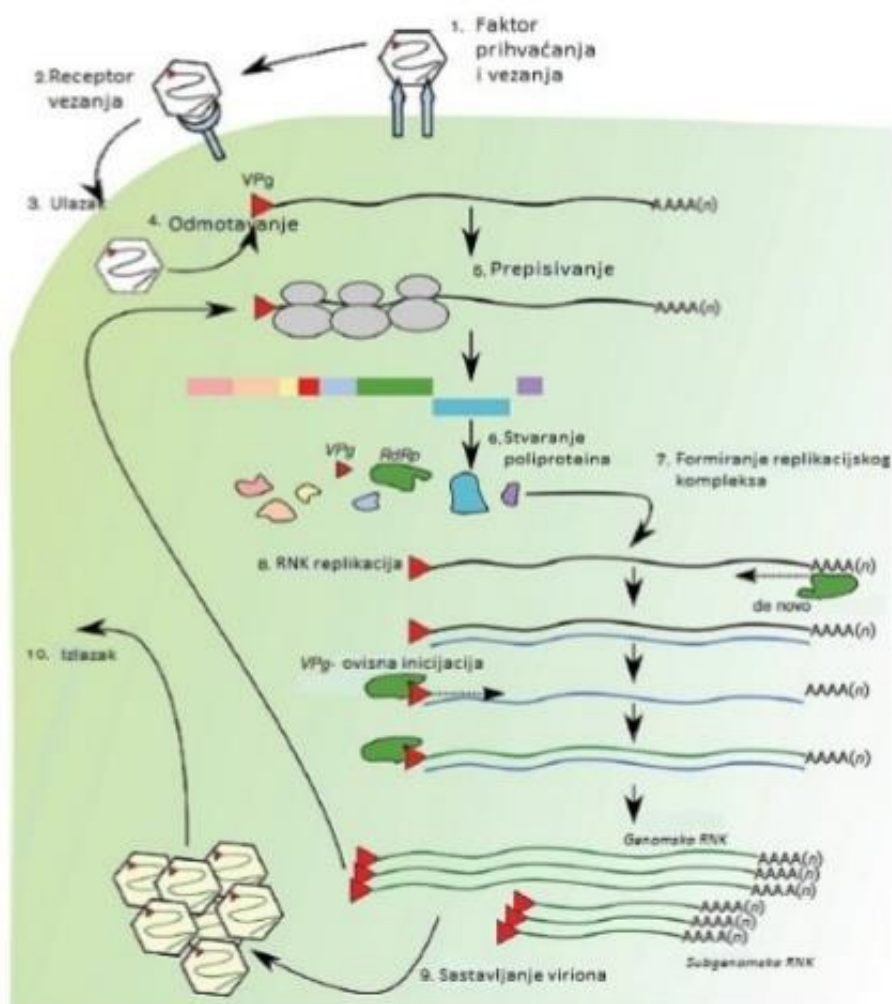
Rod Norovirus podeljen je na najmanje pet genogrupa (GI-GV). Genogrupe su označene velikim slovom "G" i rimskim brojem, a genotip je označen arapskim brojem (*Atmar, 2010*) (Slika 3.).

Genogrupe GI, GII i GIV inficiraju ljude i izazivaju akutni gastroenteritis, ali NoV je takođe izolovan iz brojnih drugih vrsta uključujući svinje (GII), goveda i ovace (GIII) i miševе (GV). U skorije vreme, ovaj virus identifikovan je kod pasa, pa je predloženo da on predstavlja novu genogrupu - GVI (*Mesquita i sar., 2010*).

Kageyama i saradnici su 2004. godine identifikovali pojedine genotipove, na osnovu RdRp sekvence, pa su tako GI podelili na 14, a GII na 17 genotipova. Prema najnovijim istraživanjima trenutno ima 33 genotipova norovirusa (GI-9; GII-19; GIII-2; GIV-2; GV1).

U poslednjoj deceniji sojevi koji pripadaju genotipu NoV GII.4 odgovorni su za većinu velikih epidemija, kao i za sporadične slučajeve gastroenteritisa (*VanBeek i sar., 2013*). Međutim, NoV GII.P17-GII.17 genotip se pominje kao glavni uzrok pojave gastroenteritisa u Kini i Japanu u periodu 2014/2015. godine (*Gao i sar. 2015; Lu i sar. 2015*). U Evropi se ovaj soj pojavio u Italiji 2015. god. kod dece u dve različite italijanske regije (*Medici i sar., 2015*).

Replikacija *Calicivirusa* slična je ostalim RNK virusima. Model za ispitivanje norovirusa je Mišji norovirus (MNV), jer samo on može da se gaji na kulturi ćelija. Inficirani miševi razvijaju simptome gastroenteritisa, pa tako ovo otkriće ima potencijal da postane budući model za kultivisanje norovirusa (*Hyde i Mackenzie, 2012*). Virioni se vežu za specifične receptore na ciljnoj ćeliji, ulaze u ćeliju i ispuštaju svoj genom u njenu citoplazmu. Glavna komponenta specifičnih receptora su ugljeni hidrati, kao što su u slučaju ljudskih norovirusa *histo-blood group antigens* (HBGAs). Interakcijom ćelijskog translacijskog mehanizma sa genomski-vezanim proteinom VPg, započinje prepisivanje budućeg pozitivno orjentisanog genoma, RNK genom se otpušta u citoplazmu i ponaša se kao mRNK (Slika 4.) (*Thorn Goodfellow, 2014*)



Slika 4. Replikacijski ciklus norovirusa (*Thorn i Goodfellow, 2014*)

2.3. Epidemiološki podaci

Virusi su široko rasprostranjeni u životnoj sredini, naročito u hrani i vodi (*Rzezutka i Cook, 2004*). Norovirus je čest uzročnik epidemijskog gastroenteritisa i okarakterisan je kao glavni uzročnik oboljenja prenosivih hranom. Po poslednjem izveštaju Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) iz 2015. godine, najznačajniji uticaj na zdravlje ljudi od svih uzočnika koji se prenose hranom, imaju upravo norovirus i hepatitis A virus. Pored njih zabeležena su oboljenja izazvana i sledećim virusima: adenovirus, astrovirus, coronavirus, flavivirus, hepevirus, influenza A virus, henipavirus, kobuvirus, enterovirus, hepatovirus, rotavirus (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2011*). Norovirus je odgovoran za oko 50% svih zabeleženih epidemija gastroenteritisa u Evropi, ali i u Sjedinjenim Američkim Državama (u rasponu od 36%- 59%) (*Patel i sar., 2009*).

Norovirusne infekcije javljaju se uglavnom u polu-zatvorenim ustanovama, kao što su starački domovi, škole, brodovi za krstarenje, bolnice ili vojne ustanove (*Sugieda, 1998*) (Slika 5.).

Norovirus može izazvati infekcije tokom cele godine, ali u predelima sa umereno kontinentalnom klimom češće se javlja u zimskim mesecima (*Lopman, 2009*). Ranije objavljene studije koje su ispitivale prisustvo norovirusa u školjkama na teritoriji Velike Britanije ukazale su na jasnu sezonsku varijaciju pojave virusa u zimskom periodu godine, od oktobra do marta (*Lowther i sar., 2010*).

Na stopu akumulacije virusa u školjkama i njihov metabolizam uticaj imaju i uslovi životne sredine, poput temperature i saliniteta mora, ali i fiziologija samih školjki (*Nappier i sar., 2008*).

Rasprostranjenost norovirusne infekcije i tačan broj obolelih teško je utvrditi i zbog činjenica da bolest protiče u akutnom toku, uglavnom se brzo završi, mali je broj prijavljenih slučajeva, te usled toga često postoji nedostatak potpunih izveštaja od strane zdravstvenih ustanova.

Tokom ispitivanja epidemiološke situacije koristi se nekoliko metoda, kao što su: utvrđivanje pojave bolesti, ispitivanje okoline, povezivanje školjki sa načinom njihovog uzgoja, eventualni podaci o fekalnom zagađenju proizvodnog područja i laboratorijska istraživanja (*Berg i sar., 2000*). Konzumacija kontaminiranih sirovih ili

nedovoljno toplotno obrađenih školjki, može dovesti do epidemije gastroenteritisa, što predstavlja globalni problem. Obrada školjki samo na pari, ne sprečava pojavu bolesti, jer i mala količina virusa ostala nakon obrade može dovesti do pojave bolesti (*Kirkland i sar. 1996*).

Prvo povezivanje izbijanja akutnog gastroenteritisa sa konzumacijom sirovih školjki, zabeleženo je u zimu 1976/1977. godine u Velikoj Britaniji (*Appleton i Pereira, 1977*). U Floridi je 1995. godine, došlo do izbijanja gastroenteritisa uzrokovanog konzumacijom školjki, s tim da je 67% ljudi konzumiralo termički obrađene školjke, ali je uprkos tome, došlo do razvoja bolesti (*McDonnell i sar., 1997*). *The European Rapid Viruses in food* (FBVE) zajedno sa *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) prijavio je 23 epidemije u periodu od 2001-2007. godine koje su povezane sa konzumacijom virusno kontaminiranih malina i školjki. Simptomi bolesti prouzrokovane norovirusom uglavnom su blagi i brzo prolaze, pa je broj prijavljenih epidemija izazvanih virusima, kako na lokalnom, tako i na međunarodnom nivou jako mali i ne daje pravu sliku o njihovoj ozbiljnosti (*Tam CC, 2003*).

U studiji sprovedenoj 2004. godine u Italiji, iz dagnji su izolovane obe genogrupe (GI i GII) istovremeno, a soj NLV/Tarrag/238/2001/Sp je izolovan i iz školjki, i iz kliničkih uzoraka, što je dokaz povezanosti kliničkih slučajeva sa konzumiranjem školjki (*Prato i sar, 2004*). Tokom zime 2012.-2013. godine u Italiji je zabeležena pojava norovirusne infekcije kod 28,9% dece hospitalizovane zbog gastroenteritisa, a tipizacijom je utvrđeno da se radi o GII.4 Sydney 2012 novoj cirkulišućoj varijanti, koja je prikazala promene epidemiologije NoV zabeležene na globalnom nivou. (*Giammanco i sar., 2013.*).

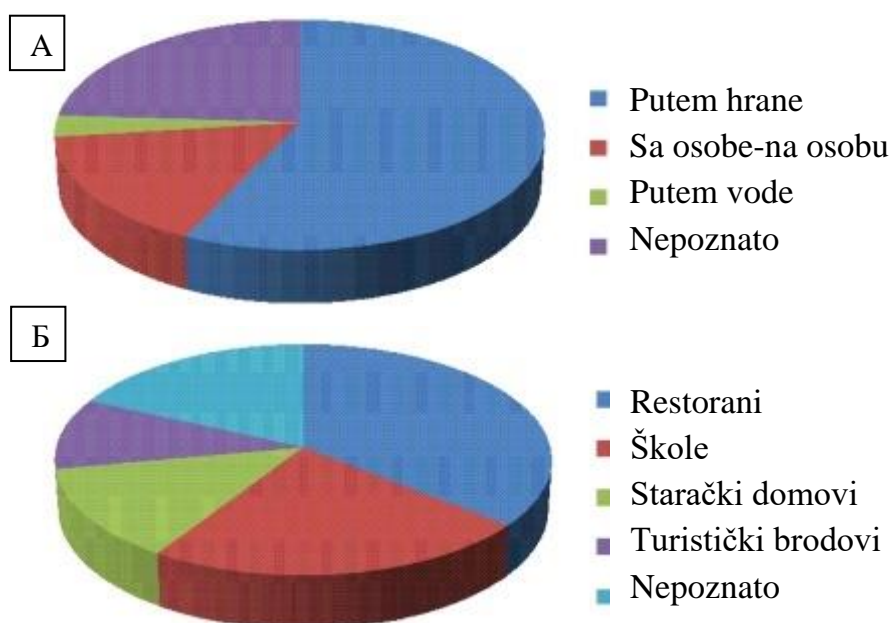
Izolacijom virusa dokazano je da kontaminirana hrana iz jedne države može izvozom izazvati izbijanje bolesti u drugoj državi (*Lopman i sar., 2003*).

2.4. Patogeneza norovirusa

Većina virusa koji se prenose hranom ljudskog su porekla, a izvor virusne kontaminacije u većini slučajeva potiče od ljudskog fekalnog materijala. Norovirus se prenosi kontaktom sa osobe na osobu (27%), ali najčešće kontaminiranom hranom (50%) kao što su školjke ili jagodičasto voće, ili kontaminiranim fekalnim vodama

(38%) (*Matthews i sar., 2012*). Međutim, dešava se da izvor kontaminacije u nekim epidemijama i ne bude otkriven (43%) (*Goodgame, 2001; Winddowson i sar., 2005; Svraka i sar., 2007*).

Širenje virusa pojačano je u periodima godine kada ima jakih kiša i kada dolazi do topljenja snega, jer se spira zemljište i virusi zajedno sa poljoprivrednim otpadom odlaze u reke, jezera i mora (*Wyn-Jones i sar., 2011*). U mnogim zemljama, obale koje se koriste za uzgoj školjki namenjenih za ljudsku ishranu, izložene su ljudskom fekalnom zagađenju odnosno ispuštima kanalizacije, spiranju zemljišta i u blizini su luka za pristajanje brodova (*Lee R, 2010*). Pored primarne, do naknadne kontaminacije hrane može doći i u bilo kojoj fazi proizvodnje ili distribucije hrane, kao i pri samoj manipulaciji hranom od strane inficiranih osoba, naročito ukoliko se hrana naknadno termički ne obrađuje (*Koopmans i Duizer, 2004; Atmar, 2010*).

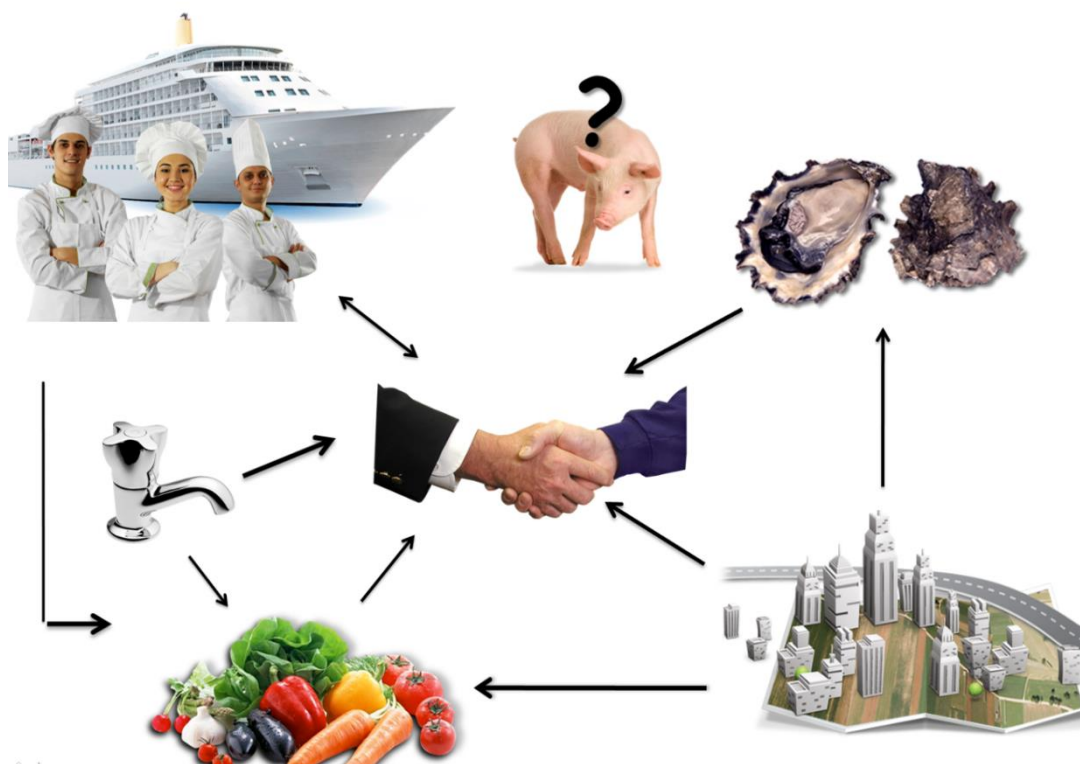


Slika 5 : Karakteristike norovirusne infekcije. A. Putevi prenosa, B. Mesta na kojima epidemije najčešće izbijaju (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus-factsheet.htm>.)

Prenošenje virusa sa životinja na ljude još nije zabeleženo, ali se smatra da postoji mogućnost zoonotske infekcije. Rađene su studije na gnotobiotičkim prasidima kod kojih je serološki detektovan humani norovirus (*Farkas i sar., 2005*), a očekuju se i

rezultati koji će pokazati da li pronađena antitela na novootkivenu genogrupu (GVI) dovode kod ljudi do pojave kliničkih simptoma bolesti i da li su životinje rezervoar iz kojeg se mogu pojaviti novi sojevi (Mesquita i sar., 2013) (Slika 6.).

Sekundarno prenošenje infekcije norovirusima podrazumeva naglo širenje u zatvorenim okruženjima u kojim se služi ista hrana većem broju ljudi, poput zdravstvenih ustanova, škola, staračkih domova i brodova za krstarenja (*Lopman i sar., 2004*) (Slika 5.).



Slika 6: Putevi prenošenja norovirusa

Norovirus je najslabije okarakterisan RNK virus zbog činjenice da, i uprkos brojnim pokušajima (*Duizer i sar., 2004; Papafragkou i sar., 2013; Takanashi i sar., 2013*), grupa koja dovodi do infekcije ljudi (HuNVs) i dalje ne može da se uzgaja na ćelijskoj kulturi. Za ispitivanje patogeneze norovirusa i njegovog širenja u životnoj sredini, koriste se takozvani surogat virusi (mišji ili pseći norovirus), koji često reaguju na stresne faktore različito od humanih sojeva. **D'Souza i saradnici** (2014) koristili su

model mačjeg Calicivirusa (*Feline Calicivirus*, FCV) i mišijeg norovirusa kao eksperimentalne modele za utvrđivanje karakteristika norovirusa i efikasnosti metoda inaktivacije.

Iako se norovirusi ne razmnožavaju niti proizvode toksine u hrani, ona služi kao sredstvo za njihovo pasivno prenošenje. Različiti faktori doprinose nastanku bolesti: niska infektivna doza, odsustvo dugotrajnog imuniteta, stabilnost virusa u okolini i mogućnost različitih načina prenošenja (*Rizzo i sar., 2007*). Infektivna doza je svega 10-100 virusnih čestica (*Bresee i sar., 2002*), a u fecesu je prisutan u visokim koncentracijama i do $10^8 - 10^{11}$ kopija virusa po gramu (*Atmar i sar., 2008*).

Virusi ne inficiraju ćelije domaćina nasumice, već ispoljavaju tropizam prema određenim grupama. Kada dovedu do invazije ćelija, preuzimaju kontrolu nad njihovim metabolizmom i sintetišu viralne proteine i nukleinske kiseline korišćenjem ćelijskih enzima. Replikacija virusa uglavnom se odvija u mukoznom endotelu tankog creva, što rezultira skraćivanjem crevnih resica, a patološke promene se odlikuju hiperplazijom ćelijskih kripti (*Caul, 1996*).

Poznata su dva mehanizma otpornosti na norovirusnu infekciju: genetska predispozicija i stečeni imunitet (*Atmar, 2010*).

Genetska predispozicija izloženih potrošača bitan je faktor u razvoju bolesti (*Le Guyader i sar., 2009*). Dokazano je da se NoV veže za antigene tkivno-krvnih ćelija, (HBGAs) i da preko njih ispoljava svoje dejstvo. Eksperimentalnim ispitivanjima ustanovljeno je da je za osobe sa krvnom grupom „B“ imaju manju verovatnoću da se razbole nakon izlaganja virusu, jer se VLPs (*engl.* Virus-like particles) norovirusa *in vitro* slabije vežu za trisaharide te krvne grupe (*Hutson i sar., 2002*). U sintezi ovih tkivno-krvnih ćelija učestvuju brojni enzimi, uključujući fukozil-transferazu 2 (FUT-2), Lewis-ov enzim (FUT3) i A i B enzimi. Enzim FUT-2 je veoma važan u prijemčivosti na infekciju, tako da su osobe koje ga ne poseduju otporne na većinu sojeva ovog virusa. Smatra se da jedna osoba može biti osetljiva na jedan ili više genotipova virusa (*Atmar, 2010*). Osobe koje su preležale infekciju jednim genotipom neke genogrupe norovirusa, mogu se inficirati sa nekim drugim. Model vezivanja virusa varira između genotipova, pa čak i unutar istog genotipa (*Lindesmith i sar., 2008*).

Drugi mehanizam rezistencije na NoV je stečeni imunitet. Osobe koje su razvile simptome infekcije, narednih 6-14 nedelja, ukoliko su izložene istom soju virusa ne

oboljevaju (*Parrino i sar., 1977*). Taj imunitet ne traje dugo, specifičan je samo za taj soj, tako da je moguće da se bolest ponovo pojavi nakon 2-3 godine. Još uvek nije potpuno razjašnjeno kako se imunitet razvija, ali se smatra da su za to odgovorni antigeni koji blokiraju VLPs da se vežu za HBGA (*Atmar, 2010*).

2.4.1. Klinička slika

Simptomi infekcije izazvane norovirusom su uglavnom blagi i karakterišu se naglom pojavom povraćanja i vodenastim dijarejama, dok je smrtnost izuzetno retka (*Atmar, 2010*). Tok infekcije je brz, traje 24 do 48 sati, sa razvojem simptoma od 12 do maksimalnih 72 sata. Bolest obično spontano prestaje i ne ostavlja značajnije posledice. Subklinička infekcija je česta i utvrđena je kod trećine eksperimentalno inficiranih osoba. Dominantan klinički simptom je povraćanje, dok se kod starijih osoba uglavnom javlja dijareja (*Hutson i sar, 2004*).

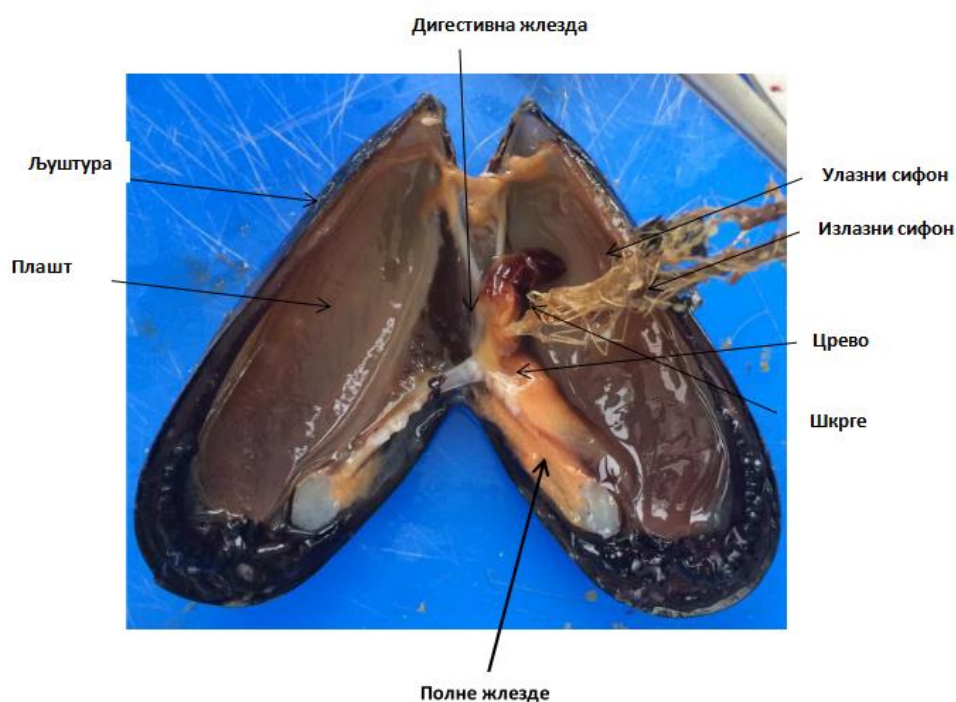
Oboljenje najčešće traje 2-3 dana, a komplikacije se mogu javiti kod dece, starijih i imunokompromitovanih osoba, kada može doći do dehidracije, bubrežne insuficijencije, instravaskularne koagulacije i hronične dijareje koja može trajati i nekoliko meseci. Smrtni slučajevi zabeleženi su uglavnom među stanovnicima staračkih domova (*CDC, 2007*). Iako bolest traje samo par dana, izbacivanje virusa se može nastaviti i do 60 dana nakon prestanka simptoma.

2.5. Dagnje kao izvor virusne infekcije

Plodovi mora predstavljaju važan izvor proteina, esencijalnih masnih kiselina, vitamina i minerala u ishrani stanovništva u mnogim krajevima sveta, naročito u priobalnih područjima. Prema najnovijim izveštajima **FAO** (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) iz 2014. godine, proizvodnja morskih plodova na globalnom nivou trebalo bi da dostigne 172 miliona tona do 2021. godine, što bi predstavljalo rast od 15% u odnosu na period od 2009-2011. godine. Svetska proizvodnja školjki u poslednjih 60 godina porasla je na 13,5 miliona kg, koliko je izmereno u 2011. godini.

Proteini čine oko 60% mase mekog tkiva dagnje i visoke su biološke vrednosti. Bogate su i vitaminima (niacin-vitamin B3, tiamin-B1 i riboflavin-B2), ali i mineralima i esencijalnim i neesencijalnim mikroelementima, čiji nedostatak može izazvati probleme u toku rasta i razvoja, posebno kod dece (*Subasinghe i sar., 2009*).

Školjke se hrane filtracijom morske vode, dnevno i do 20 litara prođe kroz njihov organizam. Okarakterisane su kao česti prenosioci i virusnih bolesti jer vodom ne samo da unose fitoplankton, zooplankton i neorganske materije, već takođe mogu akumulirati i patogene ukoliko su prisutni u vodenoj sredini (*Lees, 2000*). Voda sa kiseonikom i hranljivim materijama ulazi sa zadnje ventralne strane (ulazni sifon) kroz ljušturu u telo školjke, zatim prolazi kroz škrge i vraća se na mesto sa kojeg je ušla. Voda sa nesvarenom hranom i štetnim materijama izlazi kroz mali, izlazni sifon. Hranu pronalaze preko nervnog sistema, odnosno preko posebno razvijenog čula za pronalaženje hrane. Digestivni trakt se sastoji od jednjaka, želuca i creva. Digestivne žlezde luče enzime koji vare hrane i izlivaju se preko diverkuluma u želudac (Slika 7.)



Slika 7. Anatomска грађа školjke

Bakterije i virusi ostaju zarobljeni u sluzi dagnje, a zatim ih sluz potisne u digestivnu žlezdu, gde se patogeni koncentrišu. Koncentracija virusa u školjkama za samo nekoliko sati može biti i do 1000 puta veća od količine virusa u okolnim vodama.

Ishrana dagnje u vodenoj sredini može biti različita. Iako u ishrani dominira fitoplankton, mogu se hraniti i finim organskim detritusom, razgrađenim organskim materijama, raznim bakterijama, mikrozooplanktonom ali i neorganskim česticama.

Najvažnije grupe fitoplanktona za ishranu dagnji su:

- Alge-dijatomeje (*Bacillariophyta*)
- Dinoflagelate (*Dynophyta*)
- Silikonflagelate (*Chrysophyceae*)

Zbog načina ishrane, školjke se mogu smatrati bioindikatorima kontaminacije vodene životne sredine (*Suffredini i sar., 2012*). Vrsta koja se pokazala kao najbolji bioindikator u priobalnim područjima svakako je dagnja *Mytilus galloprovincialis*, pripada porodici Mytilidae, a pored nje uzgaja se još i *Mytilus edulis*. Živi u gustim kolonijama, pričvršćena za čvrstu podlogu, kamen, druge školjke, stubove, konopce, bove ili brodove. Može narasti do 15 cm i postići masu od 200 g. Ovim dagnjama odgovaraju područja bogata planktonom, organskim detritusom i umerenim dotokom slatke vode, pa mogu da opstanu i u zagađenim vodama luka i oko kanalizacionih otvora, što predstavlja naročitu opasnost sa aspekta bezbednosti hrane.

Glavna opasnost u vezi sa konzumacijom školjki, naročito kada se jedu sirove ili nedovoljno kuvane, jeste činjenica da voda u kojoj se gaje može biti kontaminirana. S obzirom da kuvanje dovodi do promena njihovih organoleptičkih karakteristika i nutritivne vrednosti, često se služe nedovoljno termički obrađene (*Lees i sar., 2010*). Školjke nisu pasivni prenosioci virusa, već se oni specifično vezuju za specifične ugljeno-hidratne ligande koji se nalaze u samom tkivu školjke (*Burkhardt i Calci, 2000*).

Na stopu akumulacije virusa mogu uticati i faktori životne sredine, poput temperature i saliniteta mora, ali i fiziološki faktori samih dagnji, kao što su veličina i vrsta. Velike školjke imaju kapacitet filtracije više vode i potencijalno su izloženije većem broju patogena u kontaminiranim vodama (*Nappier i sar., 2008*).

2.6. Uticaj fizičko-hemijskih parametara na otpornost norovirusa

Virusi koji se prenose hranom uglavnom su otporni na faktore životne sredine, uključujući toplotu, promenu pH vrednosti, hlađenje, zamrzavanje i stabilni su u prisustvu lipidnih rastvarača. Interesantan je podatak da je virus sa kompleksnijom strukturom manje otporan u spoljašnjoj sredini i obrnuto. Norovirus ne poseduje lipidni, već samo tanki proteinski omotač i zato ga metode koje se koriste za uništavanje bakterija (hlađenje i zamrzavanje) ne inaktiviraju.

Kada dospe u životnu sredinu, virus je veoma otporan i dugo predstavlja potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi. Norovirus može opstati u školjkama jako dugo (u morskoj vodi i do 130 dana) čak i u slučajevima kada se one prenose u prečišćene vode ili u sisteme za depurifikaciju, postupkom koji inače efikasno eliminišu bakterijsko zagađenje školjki (*Croci i Suffredini, 2003*). *Lamhoujeb i sar.* (2009) sproveli su zanimljivu studiju o opstanku norovirusa na površinama od nerđajućeg čelika i polivinil hlorida, a koje mogu da stupe u kontakt sa hranom. Zaključili su da virus može da ostane infektivan i do 4 nedelje na ovim površinama pri sobnoj temperaturi.

Međutim, na njegovu otpornost i opstanak u vodenim rezervoarima mogu uticati određeni faktori životne sredine, uglavnom kada deluju sinergistički (*Rzezutka i Cook, 2004*).

Fizičko-hemijski parametri morske vode, uključujući temperaturu, salinitet, pH, UV zrake, kao i sedimentacija virusa na dnu, utiču na njegovu otpornost i mogu da dovedu do degradacije virusa i njegovog manjeg koncentrisanja u školjkama, ali imaju uticaj i na sam metabolizam i rast školjki (*Maalouf i sar., 2010*).

Optimalna temperatura morske vode za rast dagnji iznosi 15-25°C, a pri temperaturama višim od 25°C njihova biološka aktivnost opada. Temperatura mora se uz promenu spoljašnje temperature, sezonski menja. U letnjoj sezoni temperature na površini vode su veće od onih izmerenih na dnu, dok je zimi obrnuto. Više temperature dovode do inaktivacije virusa zbog denaturacije proteina i nukleinskih kiselina, dok niže temperature produžavaju opstanak virusa (*Lipp i sar., 2001*). Osim ultravisoke temperature nema metode koja bi smanjila koncentraciju virusa za više od 3 log

vrednosti, a ako se hrana kontaminira nakon tretmana toplotom, virus će dovoljno dugo ostati aktivan da izazove infekciju. **Richards** (2012) je vršio eksperiment u kome, tokom 14 ciklusa zamrzavanja pri temperature od -80°C , a zatim zagrevanja pri $+22^{\circ}\text{C}$ GII.4 genotipa, nije uočio promene integriteta virusnog kapsida i promene stabilnosti titra viralne RNK, što dokazuje njegovu stabilnost u okolini.

Dagnjama odgovara salinitet mora od 5 do 40‰, ali je za najbrži rast optimalan salinitet u rasponu od 25-30‰. Takođe, za rast im je vrlo važan i prehrambeni potencijal morske vode, tj. sastav i biomasa planktona i količina detritusa u morskoj vodi (**Seiderer, 1985**). Salinitet raste u toku leta kao posledica povećane evaporacije i malog dotoka slatke vode. U hladnijim mesecima intenzitet vetrova je znatno veći, brža su strujanja i vertikalno mešanje je daleko intenzivnije.

Pod pH vrednošću morske vode podrazumeva se stepen kiselosti morske vode. Kiselost nastaje usled prisustva kiselina u otpadnim vodama ili usled kiselih kiša. **Wetz i saradnici** su 2004. godine ustanovili da pH zajedno sa salinitetom morske vode mogu u određenoj meri da utiču na inaktivaciju virusa.

Enterični virusi se mogu inaktivisati i ultraljubičastim svetlom koje će oštetiti nukleotide. Jedini nedostatak UV zračenja je nemogućnost potpune penetracije u matriks namirnice.

Ozon se veoma često koristi kao sredstvo za uništavanje RNK virusa, jer dovodi do peroksidacije proteinskog kapsida. Najčešće se koristi ozonska voda za ispiranje, međutim dokazano je da utiče na promenu mirisa i ukusa namirnice (**Hudson i sar., 2004**).

So, koje se vekovima koristila kao antimikrobno sredstvo, nema uticaja na viruse. Dokazano je čak da štiti viruse kod visokog hidrostatskog pritiska, tokom sterilizacije (**Kingsley i sar., 2009**). Većina virusa koji se prenose hranom je otporna i na dejstvo ultravisokog hidrostatskog pritiska, koji danas ima široku primenu u preradi namirnica kao što su školjke, džemovi, mlečni proizvodi (**Kingsley i sar., 2002**).

Fotodinamska inaktivacija je korišćenje prirodnih fotosenzibilizatora (PS) i predstavlja obećavajuću strategiju za kontrolu različitih patogena uključujući bakterije, gljivice, kvasce, protozoe i viruse (**Luksiene i Brovko, 2013**). Inaktivacija se postiže kombinovanim delovanjem boje (fotosenzitajzera), svetlosti i kiseonika koji u kombinaciji dovode do toksičnog efekta (**Jori i sar., 2011**). Senzibilizatori od svetlosti

stvaraju reaktivne kiseoničke molekule, koje će dovesti do oštećenja ćelija i na kraju apoptoze ili nekroze ćelija i do ćelijske smrti. Širok spektar efikasnosti zajedno sa mogućnošću pokretanja procesa na licu mesta, najkorisnije su osobine ovog procesa inaktivacije. Osim toga, nedavno su se u primeni našli i prirodni fotosenzibilizatori, poput hloroflina, alfa-terthienila, hipericina i kurkumina, koji se mogu koristiti u kontroli patogenih prenositelja hranom, kao i mikroorganizama kvara. Oni se dodaju takođe u rastvore za pranje ili u antimikrobne ambalaže (*Luksiene i Brovko 2013*).

Norovirusi su prilično otporni i teško se eliminišu iz tkiva školjki. Kao metoda izbora najčešće se koristi kuvanje, međutim, temeljno kuvanje može da promeni organoleptičke karakteristike dagnji. Metode koje se trenutno najčešće koriste za tretman školjki nakon izlovljavanja su depurifikacija i prenošenje u prečišćeno prirodno okruženje.

Depurifikacija je komercijalna metoda za prečišćavanje školjki koja je u širokoj upotrebi širom sveta. Tokom depurifikacije, školjke su smeštene u rezervoarima morske vode, gde se ispiraju od fekalnih nečistoća, najčešće tokom 3 dana. Međutim, istraživanja mnogih laboratorija, ustanovila su da je vreme koje školjke provedu u rezervoarima i uslovi koji se u njima nalaze nisu dovoljni za uklanjanje virusa, iako se vrlo efikasno uklanjaju bakterijski i indikatorski mikroorganizmi.

Ograničen broj studija se bavio i uklanjanjem virusa sistemom prenošenja školjki u prečišćeno prirodno okruženje, deo mora, lagune onoliko dugo koliko je potrebno da se smanji kontaminacija, kako bi bile bezbedne za ljudsku ishranu (*Richards i sar., 2010*). Ova metoda se u više navrata pokazala kao efektivna, ali sa nedostacima jer postoji mali broj područja koje su idealni za rast dagnji, kao i dodatni ekonomski troškovi, koji ograničavaju njenu upotrebu.

2.7. Bioindikator virusne kontaminacije

2.7.1. Bakterije indikatori fekalnog zagađenja

Najčešće korišćena metoda za ispitivanje prisustva virusa u školjkama koje se koriste za ishranu ljudi je praćenje broja bakterija indikatora fekalnog zagađenja (Fecal Indicator Bacteria, FIB), najčešće bakterije *Escherichia coli* u školjkama (**Reg EC 854/2004**).

Glavni problem sa bakterijama kao indikatorima je da one ne odražavaju u potpunosti prisustvo ostalih patogena kao što su virusi i paraziti, koji se ne mogu razmnožavati u okruženju posle napuštanja svog domaćina. Tako su u nekim slučajevima kada je broj bakterija bio na prihvatljivom nivou, virusi ipak pronađeni u visokim koncentracijama (**Fong i Lipp, 2005**).

Nakon brojnih laboratorijskih analiza utvrđeno je da virusi mogu mnogo duže opstati u školjkama nego bakterije, jer imaju veću otpornost na prečišćavanje. Stoga je i ustanovljeno da FIB ne mogu dati preciznu procenu rizika od kontaminacije ovim patogenom i adekvatno zaštititi potrošače (**Schwab KJ, 1998**). Prema istraživanjima **Pommepuy i saradnika** (2004), virusi mogu da prežive u morskoj sredini i više od 30 dana, za razliku od bakterija koje žive od 0.3 - 6.6 dana (**Whitehead i sar., 2016**). *E.coli* je dominantni predstavnik bakterija indikatora fekalnog zagađenja. Pripada enterobakterijama i široko je rasprostranjena u crevima zdravih ljudi i drugih sisara. Studije pokazuju da je broj bakterija koje se koncentrišu u školjkama i do nekoliko puta veći nego u okolnoj morskoj vodi (**Prieur i sar., 1990**).

Dagnje su prema vrednosti *E. coli* svrstani u mikrobiološke kategorije (Tabela 1). Prema Evropskoj regulativi (**Anon 2004a, RegEC 854/2004, Annex II, Chapter II**) o zvaničnoj kontroli živih školjki u klasifikovanim proizvodnim područjima, ta područja moraju biti jasno ograničena i podeljena u tri kategorije prema stepenu fekalne kontaminacije i kontrolisana od strane nadležnog organa. Klasi **A** pripada ono proizvodno područje odakle dagnje idu direktno na tržište bez predhodne obrade, u njima broj bakterija *E. coli* ne sme preći 230 MPN *E.coli*/100g. Te školjke moraju da ispune zdravstvene standarde regulisane odgovarjućim Pravilnikom (**Anon 2004a, Reg EC 853/2004, Annex III, Section VII, Chapter V**).

Nadležni organ može klasifikovati kao klasu **B** proizvodno područje sa koga se školjke mogu prikupljati i slati na tržište za ljudsku ishranu nakon tretmana u centrima za prečišćavanje tako da zadovolje zdravstvene standarde. U 90% uzoraka živih mekušaca iz ovih oblasti broj *E. coli* ne sme preći 4600 na 100 g mesa ili intravalvularne tečnosti, a u preostalih 10% uzoraka ne sme da pređe 46.000 *E. coli* na 100 g mesa i intravalvularne tečnosti.

Klasi **C** pripadaju školjke koje imaju veći broj bakterija od navedenih i za njih su potrebni višemesečni tretmani u prečišćenim vodama da bi mogle da dođu do tržišta i da se konzumiraju bez ograničenja.

Referentna metoda za ove analize opisana je u standardu *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli. Most probable number technique. ISO Norm 7251:2005.*

Tabela 1. Klasifikacija dagnji i kontrolne mere po zahtevima Evropske Unije

Klasifikacija	Broj <i>E.coli</i> u svežoj dagnji	Kontrolne mere	Ostali uslovi
Klasa A	< 230 MPN <i>E.coli</i> /100g	Mogu se koristiti direktno za prodaju	Moraju biti žive i higijenski ispravne u trenutku prodaje
Klasa B	<4,600 MPN <i>E.coli</i> /100g y 90% uzoraka	Pre slanja na tržište moraju proći kroz sisteme za prečišćavanje	Obavljen proces prečišćavanja.
Klasa C	<46,000 MPN <i>E.coli</i> /100g	Moraju da budu u sistemima za prečišćavanje duže od 2 meseca ili se moraju termički obraditi.	Obavljena toplotna obrada ili proces prečišćavanja određeni vremenski period
Neklasifikovano- Zabranjeno	Više od 46,000 MPN <i>E.coli</i> /100g	Ne koristi se u ishrani ljudi	

Morska voda se takodje može razvrstati na osnovu na osnovu Uredbe o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda, „Službeni list Crne Gore”, br. 2/07 u 3 klase i to:

- 1) klasu **S** - vode koje se mogu koristiti za uzgoj plemenitih vrsta ribe (salmonida);
- 2) klasu **Š** - vode koje se mogu koristiti za uzgoj školjki;

- 3) klasu C - vode koje se mogu koristiti za uzgoj manje plemenitih vrsta riba (ciprinida).

Da bi se uzgajalište svrstalo u klasu Š mora imati ograničeni broj bakterija: broj ukupnih koliforma do 100/100 ml i fekalnih koliforma do 300/100 ml.

Što se tiče ostalih mikroorganizama koji se ispituju u morskoj vodi, broj intestinalnih enterokoka treba da bude do 100/100 ml, dok *E.coli* može imati do 250/100 ml morske vode (**Uredba o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda, „Službeni list Crne Gore”, br. 2/07**).

2.7.2. Bakteriofagi

U novije vreme se sve više uviđa neprikladnost koliforma kao indikatora prisutva virusa u moru, jer je uočena slaba numerološka korelacija među njima. Stoga mnogi naučnici preporučuju korišćenje bakteriofaga, umesto koliforma, kao virusnih indikatora. Bakteriofagi su virusi koji inficiraju i razmnožavaju se u bakterijama, a slični su virusima koji dovode do oboljenja ljudi (*Mariam i Cliver, 2000*). Uslovi koje bakteriofag treba da ispunjava su sledeći: da bude specifičan, da se isključivo javlja u ljudskom fecesu i kanalizaciji; da se ne razmnožava u okruženju; da se javlja u većem broju nego virusi; da bude dugovečan; da se detektuju jeftinim i jednostavnim metodama; da karakteristike koje pokazuje u vodi budu slične onima u samim virusima (*Hurst i sar. 1994*). **Flannery i saradnici** su 2009. godine ispitivali vezu između pojave FRNA bakteriofaga i norovirusa, pri čemu su dobili jasnu korelaciju i zaključili da ga treba uzeti u obzir prilikom izrade procedura za upravljanje rizikom.

Različiti genotipovi F+ bakteriofaga su predloženi kao indikatori fekalnog zagađenja, ljudskog ili životinjskog (*Lee i sar., 2011*). Kada govorimo o koncentraciji, bakteriofaga ima manje nego bakterijskih indikatora, ali oni mogu da prežive različite procese i duže da opstanu u okruženju, te imaju veću sličnost sa virusima (*Schaper i sar., 2002*).

2.7.3. Fitoplankton

Fitoplanktonski organizmi su primarna karika u lancima ishrane, odnosno primarni producenti organskih supstanci u morskoj vodi. Sa jedne strane se ističe njihova važnost u ishrani, a sa druge strane njihov povećan razvoj može da dovede do neželjenih posledica za ekosistem. Alge su osetljive na kvalitativne i kvantitativne promene osobina vode, pa se zato javljaju kao značajni indikatori stepena zagađenosti voda. Od mikrop planktonskih komponenata, dijatomeje su bile dominante na svim pozicijama. One su prisutne tokom čitave godine, s tim da se bolje razvijaju u zimskim mesecima što se može objasniti time da je ova fitoplanktonska grupa karakteristična za hladniji period, period manjeg saliniteta i temperature, a dinoflagelati dominiraju u toplijem periodu, s obzirom da preferiraju veći salinitet i temperaturu i manju turbulenciju vodenih masa.

Hlorofil *a* se veže za dinamiku fitoplanktonske komponente, odnosno izražava biomasu fitoplanktona (mg m^{-3}). Nakon zimske cirkulacije i mešanja slojeva vode, u prolećnim mesecima (april i maj), raste temperatura vode i intenzitet svetlosti u fotičkoj zoni, te su nutritijenti, uneti padavinama i podvodnim izvorima, prisutni u dovoljnoj količini pa dolazi do brzog i intenzivnog razvoja fitoplanktona, a time i hlorofila *a*, koji sa porastom gustine troši dostupne materije.

2.8. Dijagnostika norovirusa

Monitoring za norovirus u složenim matricama kao što je hrana, odnosno školjke, zahteva osetljive i specifične metode koje mogu da detektuju niske količine virusa. S obzirom da norovirus ne može da se uzgaja na kulturama ćelija, upotreba osetljivih metoda molekularne dijagnostike je od suštinskog značaja.

Primarna dijagnostika NoV infekcije 1970-tih i 1980-tih obavljana je elektronskom mikroskopijom, ili nešto osetljivijom imunskom elektronskom mikroskopijom (*Atmar i Estes, 2001*), da bi tokom poslednjih decenija znatno napredovala i danas se primenjuju osetljivije molekularno-biološke metode kao što su enzimski-vezani imunosorbentski testovi (*Enzyme-linked immunosorbent assay*,

ELISA) i lančana reakcija polimerazom koja predstavlja zlatni standard (*Atmar, 2010*). Metode kao što su elektronska mikroskopija i ELISA su korisne ukoliko imamo kliničke uzorke, koji su bogati virusima, ali uzorci hrane, kao što su školjke, odnosno životne sredine, zahtevaju primenu drugih molekularnih dijagnostičkih tehnika (**EFSA, 2012**).

Tkivo koje predstavlja uzorak za ispitivanje je hepatopankreas, odnosno digestivna žlezda, koja čini desetinu ukupne mase dagnji, ali je koncentracija virusa u njoj najmanje za 2 log vrednosti veća nego u drugim organima kao što su škrge i plašt (*Maalouf i sar., 2011*).

Detekcija enteričnih virusa iz školjki protiče u 3 koraka:

1. Ekstrakcija virusa iz matriksa hrane
2. Prečišćavanje ekstrahovanih virusnih nukleinskih kiselina
3. Molekularna detekcija

Cilj virusne ekstrakcije je da se iz uzorka velike zapremine „uhvati“ i koncentriše što više virusnih čestica. Ono što se često dešava pri ovoj operaciji jeste gubitak virusa u toku manipulacije ili ekstrakcije ne samo virusnih već i raznih drugih inhibitornih čestica (polisaharida, proteina, glikogena, soli, lipida) koje mogu ometati dalji tok reakcije (*Sair i sar., 2002*).

Prečišćavanjem virusnih nukleinskih kiselina obezbeđuje se eliminacija pomenutih supstanci.

Postoje različite metode, ali danas se najviše koristi koncentracija alkalnim elucionim puferima i polietilen glikolom (PEG) ili korišćenjem Proteinaze K. Korišćenje proteinaze K odobrena je od strane CEN/TC275/WG6/TAG4 radne grupe kao metoda izbora za ekstrakciju enteričnih patogena iz tkiva školjke (*Lees, 2010*). Ova supstanca dovodi do digestije, oslobađa virus iz tkiva školjke i dovodi do oštećenja virusnog kapsida čime se oslobađaju nukleinske kiseline (*Stals i sar., 2012*).

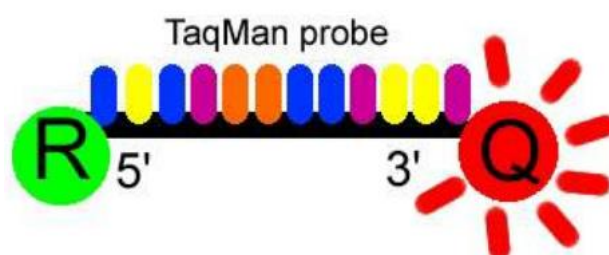
Ekstrakcija nukleinskih kiselina postiže se korišćenjem gvanidijum-tiocijanata ili danas dostupnih kompleta hemikalija kao što su QIAamp ili RNeasy kits (Qiagen) ili NucliSens (Biomérieux).

Dalje sledi molekularna detekcija virusa koja se obavlja metodom PCR (*Polymerase chain reaction*) koju je uveo je Kary Mullis, 1983. godine, dok je Real Time RT- PCR tehnika prvi put postala dostupna 1992. godine zahvaljujući **Higuchi** i saradnicima. Predstavlja najosetljiviju metodu za otkrivanje prisustva NoV u kliničkim uzorcima, jer može da detektuje i manje od 10 kopija virusa i da ih prevede u više miliona kopija (*Atmar, 2010*).

Princip funkcionisanja Real Time RT- PCR je da se tokom reakcije meri količina akumuliranog PCR proizvoda i to tako što se u klasičnu reakcionu smešu dodaje fluorescentna boja koja se, po okončanju svakog ciklusa, interkalarno veže za novosintetisani DNK fragment. Kompjuterski kontrolisana CCD kamera potom snima intenzitet svetlosti koju UV-pobuđena boja emituje iz reakcione smeše. Real Time PCR sistem upoređuje intenzitet fluorescencije u odnosu na svaki ciklus i prikazuje kinetiku procesa u obliku amplifikacione krive. U prvim ciklusima reakcije ne postoje merljive varijacije intenziteta fluorescencije, ali u tom periodu se definiše prvi značajni parametar-bazna linija amplifikacione krive. Povećanje fluorescencije iznad bazne linije predstavlja početak faze akumulacije DNK proizvoda. Drugi značajan parametar je linija praga. Ova linija je paralelna baznoj liniji, a preseca amplifikacionu krivu u fazi eksponencijalnog rasta intenziteta fluorescencije.

Amplifikaciona kriva svakog ispitujućeg uzorka preseca liniju praga u određenom ciklusu reakcije. Taj ciklus naziva se ciklus praga (threshold cycle) i označava kao Ct. Linija praga tako predstavlja početnu količinu ispitujuće DNK.

Real Time PCR sa upotrebom TaqMan fluorescentne probe (Slika 8.) zasniva se na detekciji fluorescentnog signala, koji se proizvodi proporcionalno sa amplifikacijom PCR proizvoda. TaqMan proba je oligonukleotid, dizajniran tako da na svom 5' kraju ima "reporter", molekul koji fluorescira (najčešće 6-carboxyfluorescein [6-FAM]), a na suprotnom kraju molekul koji predstavlja prigušivač fluorescencije "Quencher" (6-carboxytetramethyl-rhodamine [TAMRA]). "Reporter" molekul konstantno emituje fotone, ali fotonska energija se prenosi na "Quencher" molekul bez emitovanja svetlosti. Kada se oni međusobno udalje, prilikom amplifikacije PCR proizvoda, emituje se svetlost. Količina fluorescencije oslobođena tokom amplifikacije, proporcionalna je količini proizvoda proizvedene u svakom ciklusu.

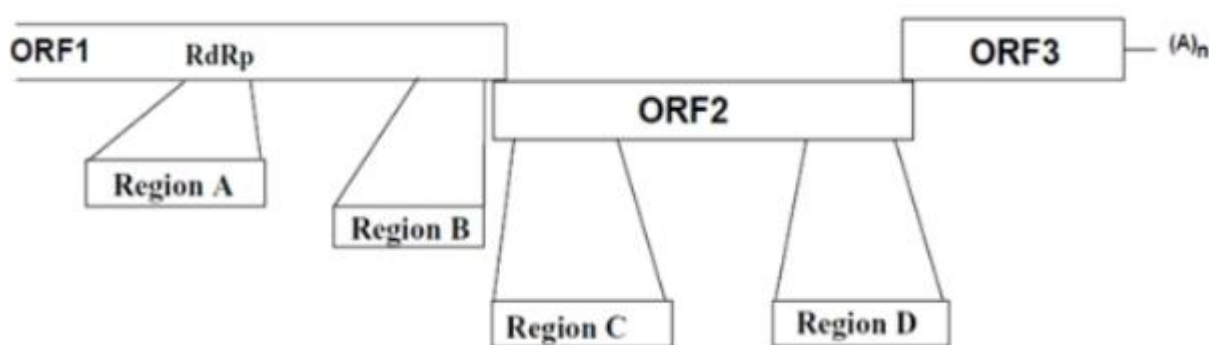


Slika 8. TaqMan proba sa “Reporter” i “Quencher” na krajevima

Ciljna regija ovog testa koji se koristi za detekciju norovirusa je konzervativna regija genoma koja uključuje polimerazu (regija A), spoj ORF1/ ORF2 (regija B) i područja u genu za sintezu VP1 (regija C i D) (*Green, 2007*). Specifičnost testa potvrđena je hibridizacijom amplikona, a podaci sekvenciranja mogu se koristiti za genotipizaciju u epidemiološkim molekularnim istraživanjima (*Yee i sar., 2007; Le Guyader i sar., 2008*).

Danas dostupni PCR testovi koji omogućavaju mnogo bržu procenu kliničkih uzoraka i glavna su tehnika detekcije NoV iz hrane, vode i drugih uzoraka imaju i svojih nedostataka (*Lopman i sar., 2012*). Detekcija NoV genoma u uzorku ne pruža informacije o infektivnosti virusnih čestica iz kojih potiču, i stoga je teško proceniti stvarnu opasnost za zdravlje čoveka.

Najveće ograničenje ove tehnike jeste izbor prajmera i proba, uz pomoć kojih će se otkriti svi, ili barem većina sojeva virusa. Do danas nije pronađen test koji bi mogao da otkrije sve sojeve norovirusa. Regioni koji se koriste za genotipizaciju i lakše otkrivanje genotipova norovirusa su polimeraza region (regija A), preklapanje ORF1/ORF2 regije (region B), kao i područje u kome se nalazi VP1 protein u ORF2 regiji (region C i D) (*Vinje i sar., 2004*) (Slika 9).



Slika 9. Područja virusnog genoma koji se koriste za genotipizaciju (*Vinjé i sar., 2004*).

Specifičnost testova može se utvrditi pomoću hibridizacionih proba ili sekvencioniranjem odnosno utvrđivanjem redosleda amplifikona, koje dalje mogu poslužiti za epidemiološke molekularne studije (*Atmar, 2010; Le Guyader i sar., 2008*). Reakcije dokazivanja GI i GII genogrupe rade se odvojeno, jer nije moguće razviti jedinstveni set prajmera koji je unakrsno reaktivan za obe genogrupe. Ciljni region je najčešće region preklapanja ORF1-ORF2, izabran od strane grupe za standardizaciju CEN/TC275/WG6/TAG4 (*Loisy i sar., 2005, Le Guyader i sar., 2009*). Pomenuta nadležna organizacija takođe je odabrala i sledeći set prajmera koji se koristi za dokaz norovirusa iz školjki: QNIF4, NV1LCR i NV1LCpr (GI) i QNIF2d, COG2R i QNIFS (GII) (*Le Guyader i sar., 2009*).

Za uspešnu reakciju neophodne su pozitivne i negativne PCR kontrole. Kontrola same reakcije najčešće se obavlja pomoću metode detekcije Mengo virusa - MC0 (*EFSA, 2012*).

„Zlatnim standardom“ u automatizovanom sekvenciranju oligonukleotida smatra se 3730xl DNA Analyzer, koji radi na principu integracije višebojnog fluorescentnog obeležavanja, kapilarne elektroforeze i softvera za analizu podataka. Za sekvenciranje u svrhu genotipizacije na ovom aparatu namenski se koriste ABI DNA Analyzer reagensi i softver. Aparat koristi metodu Sangerovog dideoksi sekvenciranja. U normalnim uslovima transkripcije ili replikacije DNK polimeraza dodaje nukleotide na postojeći lanac (prajmer) sa 3' krajem, tako što formira vezu sa 5' fosfatnom grupom nukleotida koji se vezuju u narastajući nukleotidni lanac, a elongacija se nastavlja u 5'-3' smeru. Osim uobičajenih A, G, C, T nukleotida, DNK polimeraza može u lancu polimerizovati i analoge nukleotidnih baza. Sangerova metoda koristi 2', 3'-dideoksinukleotide,

nazvane terminatori, jer im nedostaje 3'OH grupa, neophodna za formiranje fosfodiesterne veze, tako da se dalja elongacija DNK lanca zaustavlja. Svaki od ova četiri dideoksinukleotida je obojen različitom bojom.

U ovom sekvenatoru odvija se automatizovano fluorescentno sekvenciranje korišćenjem više različitih fluorescentnih boja koje služe kao markeri dideoksi baza. To ima za posledicu da se rastući lanac nosintetisane DNK prekida, pri čemu CCD kamera na optičkom detektoru snima fluorescentnu boju na osnovu koje se detektuje vrsta nukleotida (G, A, T, C).

2.9. Lečenje i prevencija norovirusne infekcije

Terapija norovirusne infekcije uglavnom je potporna: oralna rehidracija, antiemetici, analgetici, lekovi za regulisanje rada creva. Pronalaženje specifične terapije nije moguća zbog nemogućnosti gajenja virusa na kulturama ćelija. Kod jako dehidriranih pacijenata, tečnost i elektroliti se nadoknađuju intravenoznim putem, uglavnom bez dodatne terapije (*Atmar, 2010*).

Mnogo veća pažnja, bar kada su virusi u pitanju, posvećuje se prevenciji. Imunitet nakon preležane bolesti obično je kratak i usko je vezan samo za određeni soj virusa, a poznato je da je virus genetski raznorodan. Česti su slučajevi i mešovutih infekcija (*Lees, 2000*).

Trenutno ne postoji adekvatna vakcina za norovirus. Međutim, radi se na tome da se aplikacijom VLPs sa adjuvansima postigne uspešna imunska reakcija, ali je otežano zbog velike genetske varijabilnosti virusa i pojave antigenskog drifta. Pronalazak ovakve vakcine omogućio bi nadzor nad preovlađujućim sojevima norovirusa koji kruže u životnoj sredini, kao što je slučaj kod vakcine protiv gripa (*Koo i sar., 2010*).

2.10. Preventivne i kontrolne mere

Sprovođenje odgovarajućih preventivnih mera je od suštinskog značaja za kontrolu širenja virusa. Prvi korak u kontroli kontaminacije virusima je sprečavanje direktnog kontakta fekalnog materijala (u nekim slučajevima i sadržaja izbačenog povraćanjem) sa hranom. Takođe, prevencija izlivanja otpadnih voda u uzgajališta je od presudnog značaja u kontroli virusne kontaminacije školjki. Nedostatak korelacije između indeksa fekalnih koliforma i prisustva crevnih virusa može otežati prepoznavanje zagađenja, kada do njega dođe. U proizvodnim pogonima je neophodno poštovanje zahteva dobre higijenske i dobre proizvođačke prakse, s posebnim osvrtnom na ličnu higijenu radnika. Isto tako, pravilno održavanje lične higijene, uključujući upotrebu zaštitne opreme i dekontaminaciju ruku radnika i radnih površina, predstavlja prvu liniju odbrane za sprečavanje virusne kontaminacije, naročito hrane spremne za konzumiranje (*Ready to eat- RTE*). Odgovarajuće kontinuirane edukacije radnika koji rukuju hranom su takođe jedan od uslova primene preventivnih mera. Dekontaminacija površina rastvorom natrijum-hipohlorita minimalne koncentracije od 1000 ppm, zabrana radnicima da rukuju hranom tokom i 2-3 dana nakon prestanka simptoma bolesti, kao i stroga higijena naročito u zatvorenim objektima, kao što su zdravstvene ustanove, starački domovi, vrtići i škole (*Koopmans i Duizer, 2004*).

Što se tiče školjki, neophodno je da se proverí higijenski status uzgajališta i da se temeljno obrade toplotom i kada su prošle proces depurifikacije. Da bi se izbeglo zagađenje životne sredine, potrebno je kontrolisati kanalizacione ispuste i kontrolisati tretman otpadnih voda (*Koo i sar., 2010*).

3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Virusi koji se prenose hranom predstavljaju sve veći problem sa aspekta bezbednosti hrane i javnog zdravlja ljudi. Prema poslednjem izveštaju EFSA-e (EFSA-*European Food Safety Authority*) iz 2015. godine, norovirus je okarakterisan kao najčešći uzročnik epidemija koje se prenose hranom. U našoj zemlji ne postoje relevantni podaci o prisustvu ovog virusa u školjkama na tržištu, koje su najznačajniji prenosioci ovog oboljenja na ljude, a potiču iz crnogorskog akvatorijuma.

Zbog toga je stručno i naučno opravdano, što je kao cilj istraživanja u okviru ove disertacije postavljeno, da se primenom molekularno-bioloških tehnika utvrdi prisustvo, kao i da se izvrši identifikacija i genotipizacija norovirusa u dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*) poreklom iz crnogorskog akvatorijuma, tokom svih meseci u godini. Pored toga, ispitala bi se filogenetska povezanost između dokazanih izolata norovirusa sa onim ranije detektovanim i opisanim u svetu. Takođe, jedan od ciljeva je i da se utvrdi međusobna povezanost između prisustva norovirusa u školjkama sa: fekalnom kontaminacijom dagnji (broj *E. coli*), fizičko-hemijskim parametrima kvaliteta morske vode (temperatura, salinitet, pH, zasićenje kiseonikom), mikrobiološkim parametrima morske vode (ukupne i fekalne koliformne bakterije, *E.coli* i interstinalne enterokoke), fitoplanktonskom komponentom i koncentracijom hlorofila *a* u akvatorijumima.

Za ostvarenje ovih ciljeva u okviru doktorske disertacije postavljeni su sledeći zadaci:

1. Prikupiti uzorke živih dagnji (*Mytilus galloprovincialis*), tokom svakog meseca, od jula 2015. do jula 2016. godine, iz 6 registrovanih uzgajališta sa različitih lokacija u Crnoj Gori.
2. Obraditi i pripremiti prikupljene uzorke školjki, tako da digestivna žlezda bude spremna za ekstrakciju virusne RNK (disekcija i liziranje).
3. Izvršiti ekstrakciju virusne RNK korišćenjem komercijalnog seta za ekstrakciju.

4. Primenom Real-Time RT-PCR metode ispitati pripremljene uzorake dagnji na prisustvo norovirusa.

5. Utvrđivanjem nukleotidnog rasporeda i filogenetskom analizom ispitati genetsku povezanost između dokazanih izolata i onih ranije opisanih u svetu.

6. Prikupiti uzorke morske vode i ispitati njene fizičko-hemijske, mikrobiološke i biološke parametre:

- Temperaturu
- Salinitet
- pH vrednost
- Zasićenost kiseonikom
- Ukupne i fekalne koliformne bakterije, *E.coli* i intestinalne enterokoke.
- Analizirati fitoplanktonsku komponentu i koncentraciju hlorofila *a*.

7. Odrediti najverovatniji broj *E.coli* iz dagnji (*Mytilus galloprovincialis*).

8. Sistematizovati, statistički obraditi rezultate i uraditi njihovu uporednu analizu.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Prikupljanje uzoraka

U cilju dokazivanja prisustva norovirusa u dagnjama (*M. galloprovincialis*), ispitivani su uzorci digestivnih žlezda, živih školjki, koje se nalaze na tržištu u našoj zemlji, a koje dolaze sa crnogorskog akvatorijuma. Dagnje su prikupljane u jednogodišnjem periodu, svakog meseca, od jula 2015. godine do jula 2016. godine, sa šest različitih registrovanih uzgajališta. Prikupljeno je preko 1000 dagnji od kojih su formirana ukupno 72 kompozitna uzorka, a svaki uzorak sastojao se od 10-15 pojedinačnih školjki. Dagnje su prikupljane nakon 16 meseci uzgoja, tada su spremne za tržište, jer narastu do veličine između 5 i 7 cm.

Istovremeno su uzeti i uzorci morske vode, u cilju ispitivanja fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara. Uzorci morske vode za fizičko-hemijska i mikrobiološka ispitivanja prikupljani su na istom mestu i u isto vreme kada i dagnje od strane saradnika iz Instituta za biologiju mora iz Kotora. Uzorak koji se analizira propisno je uzet, Niskin-ovom sterilnom bocom od 5 L, sipan u plastične boce od 250 mL i dopremljen u laboratoriju, u roku od 24h od trenutka uzimanja.

4.1.1. Lokacije za prikupljanje uzoraka

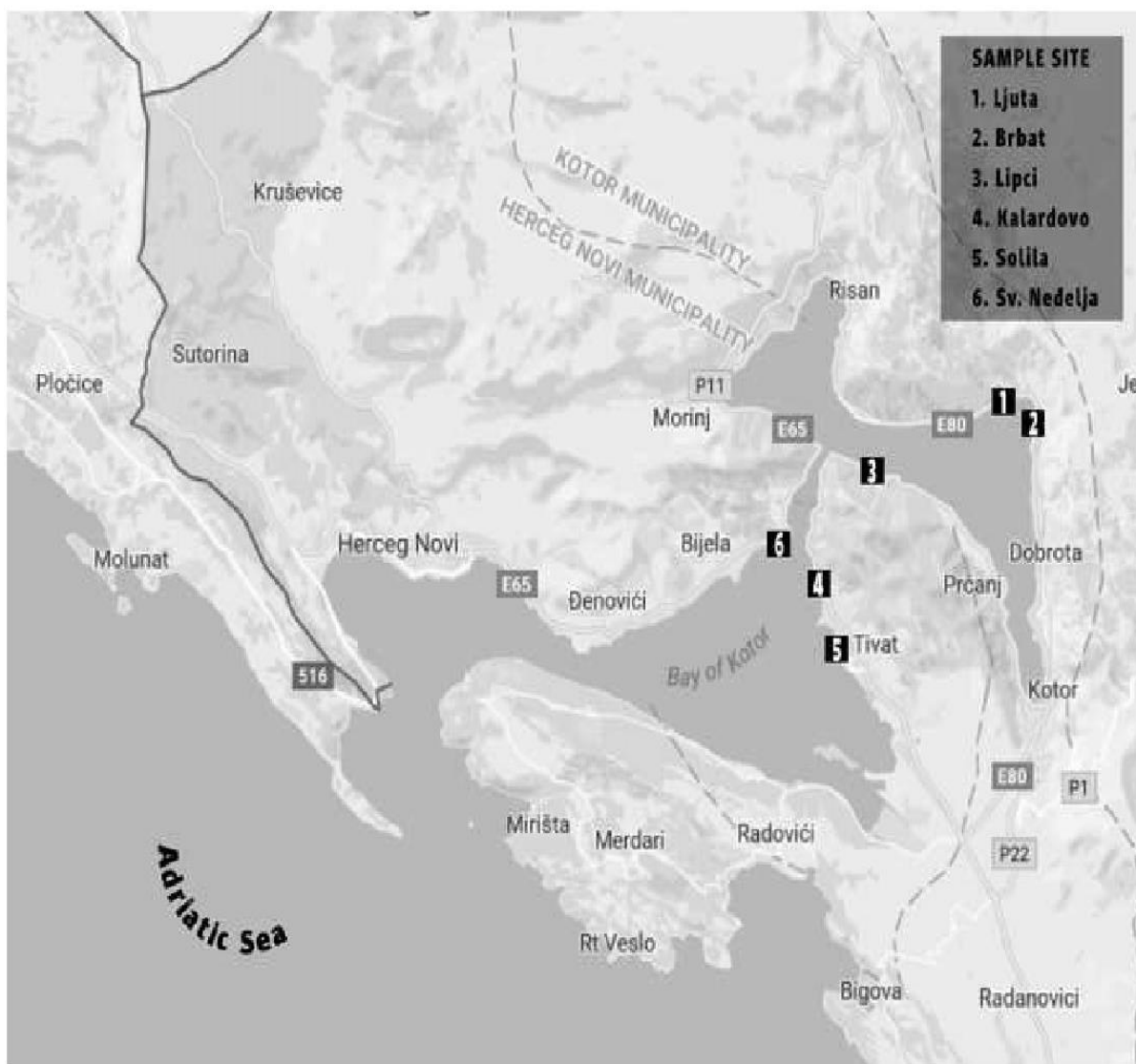
Boka kotorska, ili skraćeno Boka, istorijska je geografska oblast koja se nalazi u Crnoj Gori. Proizvodna područja za uzgoj školjki, sa kojih su prikupljani uzorci pripadaju jugoistočnoj Jadranskoj obali i mogu se podeliti u tri celine. Sa geografskog i okeanografskog stanovišta predstavlja zatvoreni bazen, koji se po klimatološkim, geomorfološkim i fizičko-hemijskim karakteristikama akvatorijuma bitno razlikuje od otvorenog dela primorja. To uslovljava velike godišnje, sezonske, mesečne i dnevne

promene fizičko-hemijskih parametara vode, pa je utvrđivanje zakonitosti nekih promena i procesa na ovom području veoma složeno.

Bokokotorski zaliv može se podeliti na: Kotorsko-Risanski, Tivatski i Hercegnovski deo, sa ukupnom površinom od 87.3 km² (0,06 % od površine Jadranskog mora), dužinom obale je 105.7 km i nalazi se između 18°25 – 18°42 istočne geografske dužine i 42°24 – 42°32 severne geografske širine. Ukupna zapremina Bokokotorskog zaliva iznosi $2,4 \times 10^6$ m³, a srednja dubina čitavog zaliva je 27,6 m. Okružen je planinskim masivima, koji u zimskim mesecima uzorkuju znatno hlađenje i pojavu leda na površini mora. Zaliv je sa jugoistočne strane opasan krečnjačkim masivima Lovćena (1749m), a sa severozapadne ograncima Orjena (1895m). To je područje intenzivnih padavina, što uslovljava da se u periodu od novembra do aprila velike količine slatke vode ulivaju u Zaliv.

Generalni tok kretanja morskih struja, u periodu manjeg dotoka slatke vode ima izlazni smer i brzine se kreću od 12-17 cm/s, a u toku kišnog dela godine i u periodu plime i oseke i do 45-50 cm/s. Pored toga, procenjuje se da se u zaliv unese 5×10^6 m³ otpadnih voda godišnje koje imaju ogroman uticaj na ekologiju mora i njegovih stanovnika. Dotoci slatkih voda u zaliv su različiti. U Bokokotorski zaliv uliva se 5 manjih rečica, a nadomak Kotorskog zaliva nalazi se područje sa najvećom količinom padavina u Evropi, Crkvice - 5840 mL kiše godišnje. Ta voda nosi i veliku količinu suspendovanih čestica koje utiču na ekološke uslove u morskoj vodi.

Uzorci dagnji koje su se koristile u istraživanju uzete su sa sledećih registrovanih uzgajališta: uzgajalište Ljuta, uzgajalište Brbat u Orahovacu, uzgajalište Lipci, uzgajalište Kalardovo, uzgajalište Solila i uzgajalište Sv. Nedelja (Slika 10.).



Slika 10. Proizvodna područja živih školjki, iz kojih su uzimani uzorci.

4.2. Priprema materijala za izolaciju virusne RNK

Po dolasku u laboratoriju, školjke su oprane pod mlazom tople vode kako bi se odstranile nečistoće, pesak i alge koje su prisutne na površini ljuštura. Kao uzorci korišćene su isključivo žive školjke sa neoštećenom ljušturicom. Otvaranje ljuštura obavljano je sterilnim nožem i to na tačno određenom mestu, gde je već delimično otvorena (Slika 11.).



Slika 11. Priprema dagnji za otvaranje

Kada je dagnja otvorena, odvojeno je tkivo hepatopankreasa svake dagnje i na taj način pripremljen kompozitni uzorak, koga je činilo 8-15 komada pojedinačnih dagnji. Disekcija tkiva digestivne žlezde izvedena je sterilnim makazama i pincetom (Slika 12.), odmerena je količina od $2 \pm 0,2$ g i prebačena u sterilnu epruvetu. Uzorak je potom zamrzavan natemperaturi od -80°C .



Slika 12. Disekcija i homogenizacija digestivne žlezde

4.3. Molekularne metode ispitivanja

4.3.1. Ekstrakcija virusa

Uzorci digestivnih žlezdi u količini od $2 \pm 0,2$ g homogenizovani su u Petrijevim šoljama do kašaste konzistencije pomoću makaza i sterilne pincete (Slika 12.). Nakon toga, prebačene su u epruvete od 50 mL u koje je dodato 10 μ L Mengo virusa vMC0 (kao kontrola procesa) i $2 \pm 0,2$ ml Proteinaze K (30U/mg; Promega) u odnosu 1:1 na zapreminu supernatanta.

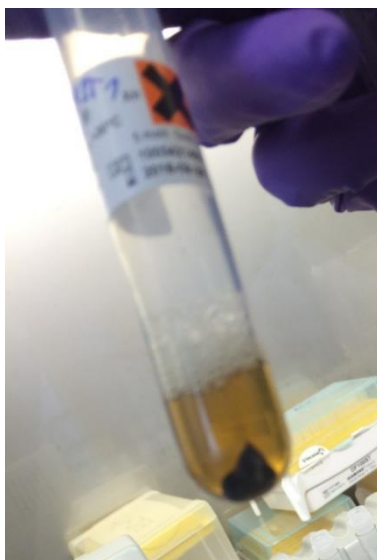
Kako bi došlo do što bolje reakcije proteinaze sa tkivom, epruveta je prvo inkubirana pri $37 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. uz mućkanje na 320 rpm u trajanju od 1 sata, a zatim je inkubirana pri $60 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 15 min. Epruveta je centrifugirana na $3000 \times g$ tokom 5 min. Konačno, zapremina dobijenog supernatanta merena je korišćenjem pipete i sipana u čistu epruvetu.

4.3.2. Prečišćavanje virusne RNA

Kao početni materijal za izolaciju virusne RNA korišćen je supernatant koji je centrifugiranjem izdvojen iz tkiva digestivnih žlezdi dagnji. Ekstrakcija RNK je izvedena korišćenjem komercijalnog kita za izolaciju NucliSens magnetic extraction reagens (BioMerieux) prema uputstvima proizvođača.

Zapremina svakog pojedinačnog uzorka iznosila je 500 μ L, i ta količina dodata je u epruvetu sa 2 mL NucliSens lysis puferom. Osim ispitivanih uzoraka, u jednu epruvetu dodato je i 500 μ L vode, koja je predstavljala negativnu kontrolu, a u drugu 500 μ L supernatanta digestivne žlezde koja je sigurno pozitivna na norovirus, i ona je predstavljala pozitivnu kontrolu.

Uzorci i kontrole su kratko vorteksovane, a zatim inkubirane pri sobnoj temperaturi, tokom 10 minuta, pre nego što je dodato po 50 μ L magnetnih kuglica u svaku epruvetu (Slika 13.). Magnetne kuglice imaju ulogu da privuku virusnu RNK koja se zalepi za njih i tako se izdvoji. Nakon toga usledila je još jedna inkubacija pri sobnoj temperaturi tokom 10 min, pa centrifugiranje na $1500 \times g$ tokom 2 min, posle čega je metodom aspiracije odliven supernatant.



Slika13. Ekstrakcija RNK

Magnetne kuglice prebačene su u nove, obeležene epruvetice od 1,5 mL u kojima se vršilo ispiranje sa tri različita pufera. Prvo je dodat pufer 1 u količini od 400 μ L i mućkan pipetom, dok se magnetne kuglice u potpunosti nisu rastvorile. Epruveta je stavljena u MiniMag aparat, čiji magneti imaju zadatak da privuku magnetnu kuglicu i odvoje je od supernatanta u periodu od 30 sekundi (Slika 14.). Supernatant se uklanja aspiracijom, a postupak sa magnetnim kuglicama i puferom 1 ponavlja se.

Ciklusi ispiranja i aspiracije ponavljani su i sa puferom 2, koji je dodavan u količini od 500 μ L i to dva puta, a zatim je sledilo završno ispiranje puferom 3, u istoj količini, ali samo jednom i to u periodu od 15 sekundi.

Magnetne kuglice zatim su resuspendovane sa 100 μ L elucionog pufera koji ima zadatak da stabilizuje RNK i postaje njen medijum. Epruvete su zatvorene i prebačene u termomikser (Eppendorf, Austria) pri 60°C/1400 rpm u trajanju od 5 minuta. Nakon toga, epruvete su prenete na magnet, koji je sakupio sve kuglice sa zidova epruvete. Supernatant (ekstrakt nukleinske kiseline) prebačen je u novu epruvetu zapremine 0,5 ml, koja se dalje koristila za sledeću reakciju.



Slika 14. Rad MiniMag aparata

4.3.3. Amplifikacija virusne RNK primenom Real-Time RT-PCR metode

Svi uzorci podvrgnuti su postupku reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu u istom koraku (engl. Real-time, one- step RT-PCR). Za amplifikaciju RNK svakog pojedinačnog virusa korišćen je komercijalni set „UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System“ (Life Technologies, Carlsbad, California, US). S obzirom na veliku varijabilnost norovirusa, za umnožavanje dela genoma svakog pojedinačnog genotipa (GI i GII) odabrana je jako konzervativna regija na 5' kraju ORF2 (*Kageyama i sar., 2003*) i korišćeni su specifični parovi prajmera: QNIF4 (*Da Silva i sar., 2007*), NV1LCR (*Svraka i sar., 2007*), QN1F2 (*Loisy i sar., 2005*), COG2R (*Kageyama i sar., 2003*). Za potrebe vizuelizacije umnoženog dela genoma korišćene su Taqman® probe: NV1GG1p (*Svraka i sar., 2007*) i QN1FS (*Loisy i sar., 2005*) (Tabela 2.). Svaka proba je na svom 5' kraju obeležena FAM fluorescentnom bojom (zeleni fluorescentni signal), a na 3' kraju sa TAMRA “quencher” bojom.

Tabela 2. Prajmeri i Taqman® probe korišćene u molekularnoj identifikaciji RNK ispitivanih genotipova norovirusa primenom Real-Time RT-PCR tehnike.

	Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Referenca
GI	QNIF4 (FW)	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	Da Silva i sar., 2007
	NV1LCR (REV)	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	Svraka i sar., 2007
	NV1GG1 (PROBA)	6-FAM-5'- TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-3'-TAMRA	Svraka i sar., 2007
GII	QN1F2 (FW)	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	Loisy i sar., 2005
	COG2R (REV)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	Kageyama i sar., 2003
	QN1FS (PROBA)	6-JOE-5'- AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG- 3'- TAMRA	Loisy i sar., 2005

FW – Forward prajmer, Rev – Reverse prajmer

Svaka Real-Time RT-PCR reakcija izvedena je u zapremini od 25 μ L, a sadržala je: 5 μ L RNK, 1,25 μ L 1 \times Ultrasense reaction mix, 5 μ L RNA Ultrasense 5 \times enzyme buffera (Invitrogen), 500 nM Forward prajmera, 900 nM Reverse prajmera i 250 nM probe i H₂O dodate do tražene zapremine.

Reakcije su izvedene na Real-Time PCR aparatu „Stratagene Mx3005P“. Za traženi virus temperaturni i vremenski režim sastojao se iz: reverzne transkripcije (55°C, 60 minuta), inicijalne aktivacije enzima (95°C, 5 minuta) i 45 ciklusa denaturacije (95°C, 15 sek.), hibridizacije prajmera i proba (60°C, 1 min) i elongacije DNK (65°C, 1 minut).

Vizuelizacija dobijenih produkata omogućena je posmatranjem nivoa fluorescencije u vidu specifičnih dijagrama i korišćenjem kompjuterskog softvera koji je obezbeđen od strane proizvođača aparata. Grančne vrednosti podešene su na 0.20 fluorescentnih jedinica, pa su Ct vrednosti izračunate korišćenjem Mx3005P sistemskog softvera.

4.3.4. Procesni kontrolni materijal

Kao procesni materijal korišćen je Mengo virus (MC0) koji spada u porodicu *Picornaviridae*, rod *Cardiovirus*. Ovaj eksterni virus je nepatogen, sa karakteristikama sličnim virusu koji tražimo (*Martin i sar., 1996*). U dagnjama se prirodno ne nalazi, pa se dodaje kao kontrola efikasnosti ekstrakcije RNK (*Le Guyader i sar., 2009*).

Za reakciju je korišćen Mengo virus-specific TaqMan reaction mix u zapremini od 25 μ L koji je dodavan u 5 μ L ekstrakta nukleinske kiseline na osnovu standarda ISO/TS 15216-2:2013: *Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 2: Method for qualitative detection*.

4.4. Sekvenciranje dela genoma

S obzirom da je spoj ORF1 i ORF2 regije norovirusa evolutivno visoko očuvan i kao takav pogodan za proučavanje filogenetske srodnosti izolovanih sojeva NoV, ovaj deo viralne RNK uzet je kao matrica za amplifikaciju i sekvenciranje oligonukleotidnog fragmenta veličine 330 bp (NoV GI), odnosno 344 bp (NoV GII). Pošto se ispituje prisustvo virusne jednolančane RNK, reakciji PCR mora da prethodi proces reverzne transkripcije (RT) korišćenjem enzima reverzne transkriptaze poreklom iz virusa avijarne ili murine leukemije. Zato se koristi kit koji uključuje jedan korak više u PCR reakciji (RT PCR).

Za PCR amplifikaciju navedenih fragmenata korišćen je komercijalni kit One Step RT-PCR Mix Kit (QIAGEN, Valencia, CA, SAD) koji se sastoji od: 5× Qiagen One Step RT-PCR Buffer, 5× Q solution, Qiagen OneStep RT-PCR enzyme mix, dNTP Mix, RNA-sa slobodna voda. Sastav reakcione smeše prikazan je u Tabeli 3.

Tabela 3. Sastav smeše za ispitivanje jednog uzorka metodom RT qPCR

Reaktant	Količina po 1 reakciji
RNA-sa slobodna voda	6 µL
5× Qiagen One step RT PCR Buffer	4 µL
dNTP Mix	0,8 µL
5×Q solution	4 µL
Forward primer (10µM)	1,2 µL
Reverse primer (10µM)	1,2 µL
Qiagen One Step RT PCR enzyme mix	0,8 µL

Prajmeri korišćeni u lančanoj reakciji polimeraze za amplifikaciju navedenih fragmenata, navedeni su u Tabeli 4.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni u lančanoj reakciji polimeraze

Naziv prajmera	Redosled nukleotida u 5'-3' pravcu	Veličina amplikona, bp
NoV GI		
G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	330
G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	
NoV GII		
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	344
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	

Ukupna zapremina reakcione smeše iznosila je 20 μ L, a sastojala se od 18 μ L mastermiksa i 2 μ L uzorka RNK. Pripremljene smeše sa uzorcima postavljane su u termalsajkler (AB2720, USA). Pri tome je korišćen sledeći protokol:

1. Reverzna transkripcija pri 50°C tokom 30 min
2. Inicijalna denaturacija pri 94°C tokom 2 min
3. Denaturacija pri 94°C tokom 30 s + annealing pri 50°C tokom 60 s + elongacija pri 72°C tokom 60 s (35 ciklusa)
4. Finalna ekstenzija pri 72°C tokom 7 min.

Nakon amplifikacije i vizuelizacije bendova u 1,5% TBE agarozu gelu obojenom SYBR Green fluorescentnom bojom (AB, USA), dobijeni proizvodi su dva puta prečišćeni i mašinski sekvencirani. Posle završenog sekvencionog PCR-a i vizuelizacije amplifikata, uzorci su prečišćeni dodavanjem Sephadex-a G - 50 (Sigma Aldrich) i propuštanjem kroz kolonu za filtriranje. Rastvor Sephadex-a za purifikaciju pripremljen je na način da je odmereno po 1 g Sephadex G – 50 koji je stavljen u tubu od 50 mL. Dodato je 11,0 mL purifikovane vode i inkubirano 10 min pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, 800 μ L ovog rastvora dodato je u Nucleoseq (MN, Nemačka) kolone i centrifugirano na 2.600 o/min u trajanju od 2 minuta. Potom je promenjena

tuba za kolekciju eluata, dodat je prethodno purifikovan PCR produkt u samo središte kolone. Sve je centrifugirano 2 minuta na 4800 o/min.

Sledeće prečišćavanje PCR proizvoda urađeno je prema dokumentovanom uputstvu proizvođača kita za purifikaciju (Mini Elute purification kit, Qiagen) i to prema sledećem protokolu:

- Pripremljeni su radni rastvori svih pufera u kitu dodavanjem etanola u propisanoj količini
- Prethodno purifikovanom proizvodu PCR reakcije dodat je pufer PBS u zapremini pet puta većoj od zapremine gotovog proizvoda RT PCR reakcije;
- Smeša je homogenizovana na vorteksu u trajanju od nekoliko sekundi;
- Posle toga, smeša je prebačena u mini kolone za filtriranje centrifugiranjem;
- Zatim je izvršeno centrifugiranje uzoraka smeše u trajanju od 1 minut na 8000 o/min;
- Eluati su odbačeni i u mini kolone dodato je po 750 μ L pufera PE;
- Sadržaj uzoraka smeše u minikolonama centrifugiran je 1 minut na 8000 o/min;
- Zatim je izvršeno odbacivanje eluata, dok su kolone još jednom centrifugirane 1 minut na 8000 o/min do potpunog odstranjivanja pufera PE sa membrane;
- Minikolone su zatim prebačene u nove tube za sakupljanje prečišćene DNK;
- U svaku minikolonu dodato je po 10 μ L pufera EB (elution buffer) za eluciju prečišćene DNK;
- Miniklone su inkubisane 1 minut na sobnoj temperaturi od 20-22°C;
- Posle toga izvršeno je centrifugovanje uzoraka u kolonama 1 minut na 8000 o/min i dobijene su purifikovani PCR produkti cDNK;
- Uzorci purifikovane cDNK čuvani su pri temperaturi od -80°C do postupka sekvenciranja.

Sekvenciranje je izvedeno korišćenjem Sanger Sequencing One Shot Read tehnika na aparatu Roche GS FLX Titanium 454 u kompaniji GATC Biotech, Nemačka, korišćenjem POP 7 polimera i 36 cm kapilara. Podešavanja sekvencera su izvršena prema preporukama proizvođača. Radi što preciznije identifikacije sekvencirana su oba lanca fragmenta komplementarne DNK. Rezultati sekvenciranja predstavljeni su u

obliku hromatograma i datoteka u FASTA formatu. Za identifikaciju izolata korišćen je BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) softver za prepoznavanje visokosličnih sekvenci.

4.4.1. Filogenetska srodnost

Primarna genotipizacija Norovirusa izvršena je korišćenjem *Norovirus genotyping tool v.2.0* (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>). Zatim su poređene oligonukleotidne sekvence u 5'-3' i 3'-5' pravcu. Nakon verifikacije o podudarnosti komplementarnih nukleotida, sekvence su upoređene sa norovirusnim sekvencama dostupnim u banci gena (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Za izradu filogenetskog stabla, iz banke gena učitane su sekvence referentnih sojeva za svaki genotip. Sekvence su poravnate pomoću algoritma Clustal W implementiranog u programu MEGA 7. Nakon sravnjivanja odstranjeni su nekvalitetni krajevi sekvenci, pa je dobijena uniformna sekvenca (engl. *alignment*) od ukupno 27 sekvenci, svaka dužine 250 bp.

Provera reproducibilnosti specifičnih karakteristika rezultata filogenetske analize fragmenata ORF1 i ORF2 izvršena je pomoću Neighbor-joining (NJ) metode uz samoučitavanje 1000 (engl. *bootstrap*) i Kimura-2 evolutivni model. Dobijene sekvence nukleotida upoređene su sa referentnim sekvencama NoV GI i GII.4 gena, objavljenim u GenBank-u NCBI.

4.5. Fizičko-hemijske analize morske vode

Uzimanje uzoraka morske vode za hidrografska ispitivanja vršena je pomoću Niskinove boce zapremine od 5 L, na dubini od 0,5 m. Morska voda uzorkovana je na istom mestu i u isto vreme kada i dagnje. Odmah nakon uzorkovanja izmerene su vrednosti osnovnih fizičko-hemijskih parametara (temperatura, salinitet, pH). Vrednosti osnovnih fizičko-hemijskih parametara određivani su automatskim sondama *MultiLine 4*, WTW (Slika 15.).



Slika 15. Automatska sonda- *MultiLine 4*, WTW

Koncentracija rastvorenog kiseonika u uzorku određena je jodometrijskom titracijom po Winkleru. Staklena bočica baždarenog volumena napunjena je uzorkom morske vode i dodato je 1 ml rastvora manganovog sulfata ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 365 gL^{-1}) i 1 ml baznog rastvora kalijum jodida (NaOH ; 500 g L^{-1} i KJ ; 300 gL^{-1}). Došlo je do nastajanja taloga manganovog oksida koji je nakon nekoliko puta mućkanja sadržaja bočice i dekantiranja bistrog supernatanta rastvoren u 1 ml razređene sulfatne kiseline (1:1). Pri tome Mn^{4+} jon oksidira jodidni jon u elementarni jod koji je titrovan rastvorom natrijumovog tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; $0,02 \text{ mol/L}^{-1}$) uz rastvor skroba kao indikator. Rastvor natrijumovog tiosulfata standardizovan je rastvorom kalijum dihidromata ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 1 mol L^{-1}). Sadržaj rastvorenog kiseonika izražen je kao volumni odnos. Preciznost ove metode iznosi 0,05.

4.6. Mikrobiološki parametri morske vode

Uzorci za mikrobiološku analizu morske vode uzimani su jednom mesečno, na svim ispitivanim lokalitetima, sa dubine od 0,5 m. Uzorak je uziman sterilnom bocom od 250 mL koja je zatvorena i do laboratorije dopremljena u frižiderima pri 4°C . Odmah nakon transporta uzorka pristupalo se njegovoj obradi.

Određivanje broja *E. coli* i koliformnih bakterija rađen je prema ISO 9308-1:2015-*Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*, a interstinalnih enterokoka prema ISO 7899-2:2011 *Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method*.

4.7. Kvantitativna i kvalitativna analiza fitoplanktonske komponente

Uzorci za analizu fitoplanktona su uzimani pomoću Niskin-ove bočice od 5 L i sipani u plastične bočice od 250 mL. U laboratriji su zatim, uzorci sipani u komorice za sedimentaciju i nakon sedimentacije u trajanju od 24h pristupilo se obradi uzoraka. Analiza fitoplanktonskog materijala je izvršena po standardnoj metodologiji pomoću invertnog mikroskopa Leica DMI4000 B metodom po **Utermöhl** (1958), uz korišćenje komorica za sedimentaciju zapremine 25 cm³.

Veća veličinska frakcija - mikrop plankton (ćelije > 20 µm) je analizirana do vrsta pomoću odgovarajućih ključeva koji se primjenjuju za ovu oblast (**Hasle i Syvertsen 1996**). Kao indikatori eutrofikacije se koriste fitoplanktonske vrste mikrofitoplanktona, kako njihovo prisustvo tako i njihova gustina. Manja veličinska frakcija - nanoplankton (ćelije < 20µm) prikazana je kao ukupna količina po istraživanim pozicijama. Količina fitoplanktona (mikrop plankton i nanoplankton) je izražena preko numeričkih vrednosti na jedinicu volumena morske vode (broj ćelija / L) po istraživanim pozicijama.

Za izračunavanje koncentracije hlorofila *a* koristili smo metodu ekstrakcije pigmenta po **APHA (1995)** и **Jeffrey-y (1997)**. Uzorke vode smo odmah nakon uzorkovanja sipali kroz najlonsku mrežu promera 300 µm (da bi se odstranile velike jedinice zooplanktona), a nakon toga smo koristili Whatman GF/F 0,7µm za filtraciju. Profiltrovani uzorak stavili smo u avan i dodali 5 mL 90% rastvora acetona i macerirali. Postupak smo ponovili dva puta. Nakon toga uzorke smo ostavili da odstoje 2 h na 4°C u mraku i cetrufugirali na 2000 obrtaja 20 minuta. Čist ekstrakt prelili smo u kivetu i spektrofotometrom na talasnim dužinama 630, 647, 664, 750 merili smo optičku gustinu (adsorbancu) ekstrakta. Koncentracija hlorofila se dobija preračunom iz sledeće formule:

$$\text{Chlorophyll a} = (11.85 * (\text{E664} - \text{E750}) - 1.54 * (\text{E647} - \text{E750}) - 0.08 (\text{E630} - \text{E750})) * \text{Ve} / \text{L} * \text{Vf}$$

L = dužina kivete u centimetrima.

Ve = zapremina ekstrakta u mililitrima.

Vf = zapremina filtrata u litrima.

4.8. Broj *E.coli* u dagnjama

Određivanje najverovatnijeg mogućeg broja *E.coli* u dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*) izvedeno je prema ISO TS 16649-3:2005 *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli. Most probable number technique. ISO Norm 7251:2005. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland*. Uzorak je činilo 50 g homogenata, napravljenog od mesa i intravalvularne tečnosti dagnje sa dodatkom 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronida. Rezultati su beleženi kao MPN / 100 g homogenata.

4.9. Statistička obrada rezultata

Za statističku analizu dobijenih rezultata korišćeni su deskriptivni statistički pokazatelji: mera centralne tendencije, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke, interval varijacije i koeficijent varijacije.

Dalja statistička analiza odvijala se u zavisnosti od toga da li su analizirani podaci normalno distribuirani ili ne. Normalno distribuirani podaci analizirani su Kolmogorov-Smirnov testom. U slučaju normalne distribucije podataka za poređenje signifikantnih razlika između eksperimentalnih grupa korišćena je parametarska analiza varijansi (One way analysis of variances).

U slučaju kada distribucija podataka nije normalna, upotrebljavana je ne-parametarska Kruskal-Vallisova analiza varijanse (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks).

U slučaju da su postojale statistički signifikantne razlike između grupa, parovi grupa su poređeni međusobno na osnovu parametarskog Tukey testa, odnosno ne-parametarskog Dunn's Multiple Comparison testa i χ^2 kvadrat testa.

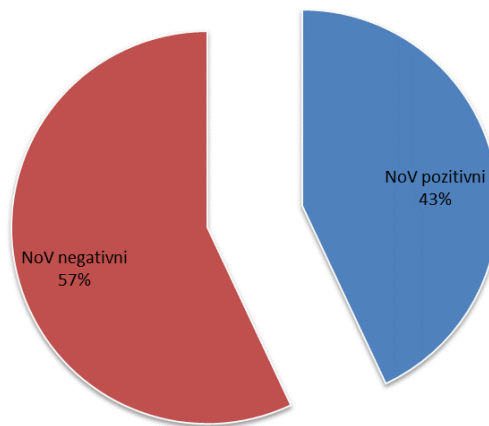
Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5 i 1 %. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza izvedenog eksperimenta urađena je u GraphPad Prism verzija 6.00 za Windows, (GraphPad Software, San Diego, California USA), www.graphpad.com i MS Excel-u.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Prisustvo i zastupljenost norovirusa

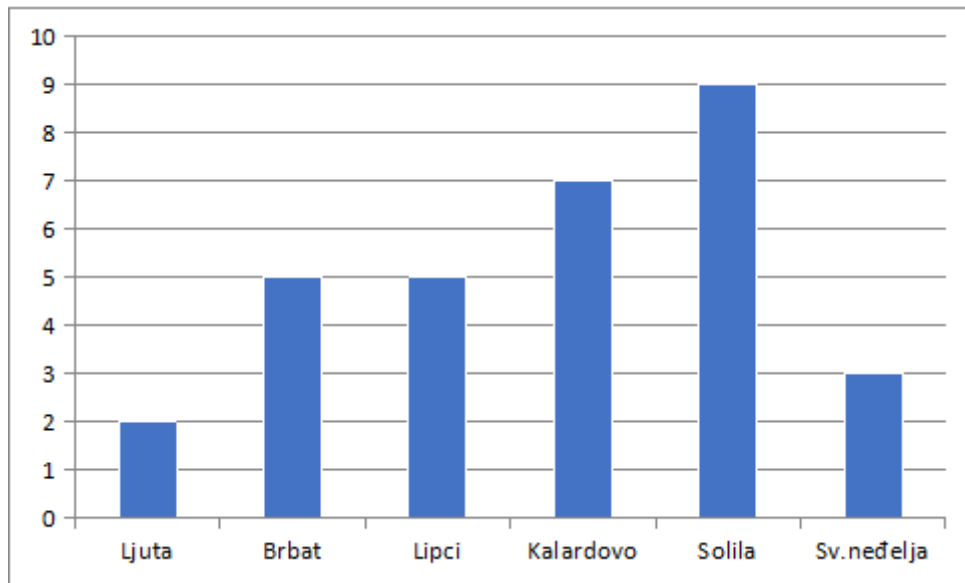
Izolacija i identifikacija uzročnika norovirusa poreklom iz dagnji izvršena je metodom Real Time RT-PCR na osnovu ISO standarda 15216:2013 *Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 2: Method for qualitative detection*.

Utvrđeno je da je od ukupno 72 uzorka, 31 uzorak (43%) bio pozitivan, dok je veći broj uzoraka, 41 (57%) bio negativan na prisustvo ovog virusa (Grafikon 1).



Grafikon 1. Procentualna zastupljenost norovirusa u uzorcima dagnji

Obradom rezultata, utvrđeno je da je norovirus prisutan u dagnjama sa svih ispitivanih proizvodnih područja. Od ukupno 31 pozitivnog uzorka, najveći broj izolovan je iz dagnji sa uzgajališta Solila (9), a najmanji sa uzgajališta Ljuta. Regionalna distribucija pozitivnih uzoraka prikazana je na Grafikonu 2.

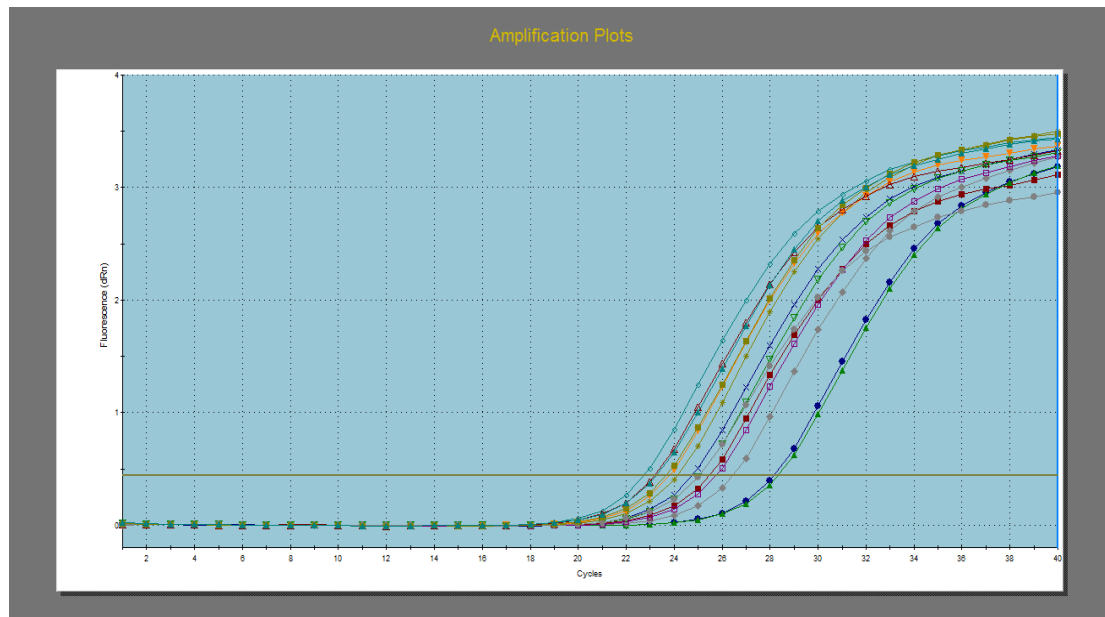


Grafikon 2. Regionalna distribucija pozitivnih uzoraka na norovirus

Sa geografske mape (Slika 10.) ove obale vidi se da su tačke na kojima su uzorkovane školjke geospacijalno veoma bliske, pa zbog distribucije norovirusa strujama i kretanjem mora, nalaz norovirusa na svim tim uzgajalištima nije neočekivan.

5.2. Rezultati dokazivanja virusne RNK Real Time RT- PCR metodom

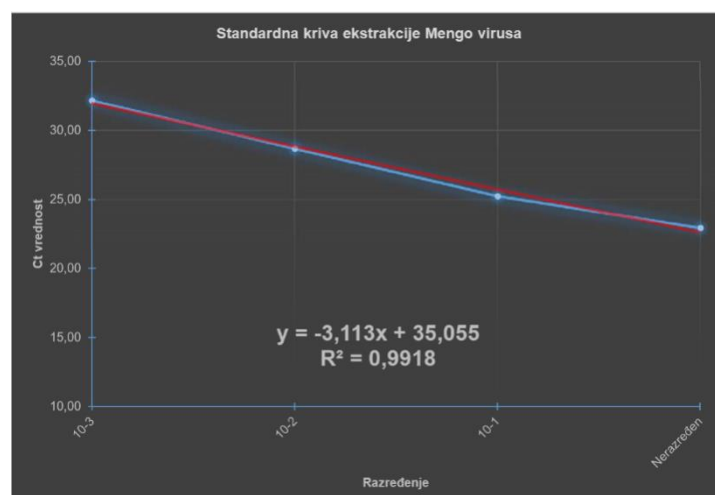
Prisustvo i zastupljenost norovirusa u izolovanom materijalu, poreklom iz digestivne žlezde dagnji ispitivano je upotrebom Real-Time RT-PCR metode bazirane na „TaqMan“ probama i primenom komercijalnog kompleta hemikalija UltraSense reaction kit (Invitrogen, USA). Tim postupkom amplifikovani su delovi gena za sintezu kapsida (98 pb) norovirusa GI (*Da Silva i sar., 2007; Svraka i sar., 2007*) i delove visoko konzervativne regije ORF1-ORF2 (95 pb) norovirusa GII (*Kageyama i sar., 2003; Loisy i sar., 2005*) (Slika 16.).



Slika 16. Amplifikacione krive norovirusa poreklom iz dagnji

Paralelno sa amplifikacijom gena za sintezu kapsida, odnosno ORF1/ORF2 regije, amplifikovan je fragment Mengo virusa (MC0) radi evaluacije efikasnosti ekstrakcije (*Costafreda i sur., 2006*). Mengovirus je dodat u homogenizat hepatopankreasa na početku ekstrakcije kao eksterna kontrola. Rezultati amplifikacionih kriva Mengo virusa dodanog u uzorke (Slika 17.) smatrani su, na osnovu standarda, prihvatljivim ukoliko je efikasnost ekstrakcije $\geq 3\%$.

Efikasnost ekstrakcije za sve ispitivane uzorke iznosila je od 3,08-6,21%.



Slika 17. Standardna kriva ekstrakcije

5.3. Genetska identifikacija i filogenetska analiza norovirusa poreklom iz dagnji

Od ukupno 31-og uzorka, pozitivno identifikovanim na prisustvo norovirusa korišćenjem metode ISO 15216:2013 (Ct<35), kod 4 uzorka utvrđeno je prisustvo samo norovirusa genogrupe GI, kod 17 uzoraka prisustvo samo norovirusa genogrupe GII, dok je kod 10 uzoraka utvrđeno istovremeno prisustvo norovirusa obe genogrupe (GI+GII).

Svi pozitivni uzorci su zatim podvrgnuti amplifikaciji odgovarajućih sekvenci ORF2 regiona radi genotipizacije i ispitivanja filogenetske srodnosti poređenjem sa podacima iz Genbank baze.

Od 14 uzoraka pozitivnih na NoV GI (4 pozitivna samo na GI i 10 pozitivnih i na GI i na GII), kod samo 4 uzorka došlo je do uspešne amplifikacije ORF2 sekvence, veličine 330 bp, karakteristične za genogrupu GI. Razlog tome je nedovoljna količina generisane DNK koja bi se mogla koristiti za sekvenciranje.

Korišćenjem *on line* softvera *Norovirus genotyping tool* v. 2.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>, RIVM, Holandija), utvrđeno je da sva 4 uzorka norovirusa genogrupe GI pripadaju genotipu GI.2 (Slika 18.).

Norovirus Genotyping Tool Results

You may bookmark this page to revisit results of this job (202516558) later.

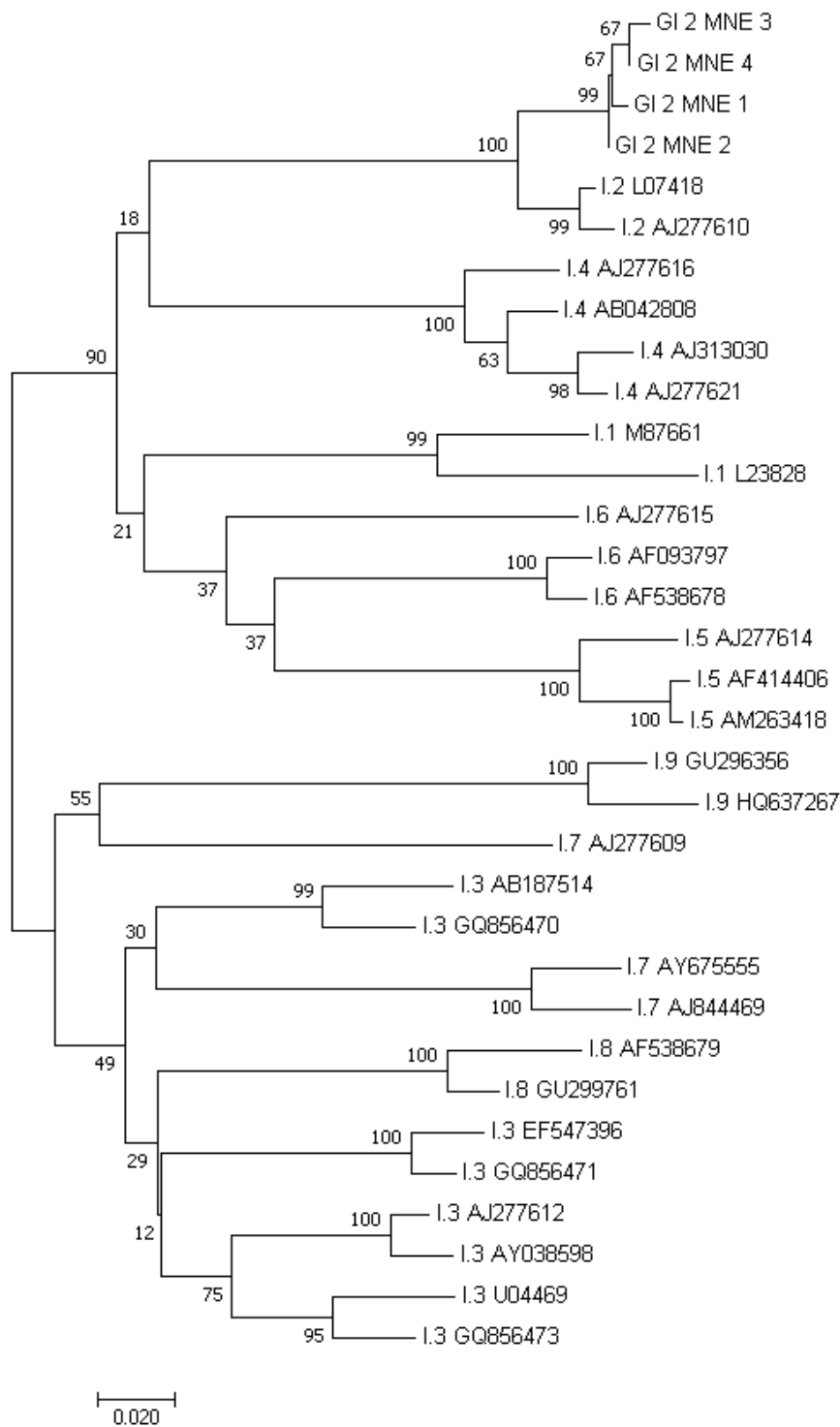
Name	Length	Family Genus Genogroup	BLAST score	ORF1	ORF2	Report	genome
GI_2_MNE_1	246	Caliciviridae Norovirus GI	94.273125		GI.2	Report	
GI_2_MNE_2	256	Caliciviridae Norovirus GI	95.06726		GI.2	Report	
GI_2_MNE_3	252	Caliciviridae Norovirus GI	94.273125		GI.2	Report	
GI_2_MNE_4	250	Caliciviridae Norovirus GI	94.71366		GI.2	Report	

Slika 18. Genetska identifikacija norovirusa genogrupe GI, korišćenjem *on line* softvera *Norovirus genotyping tool* v. 2.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>, RIVM, Holandija)

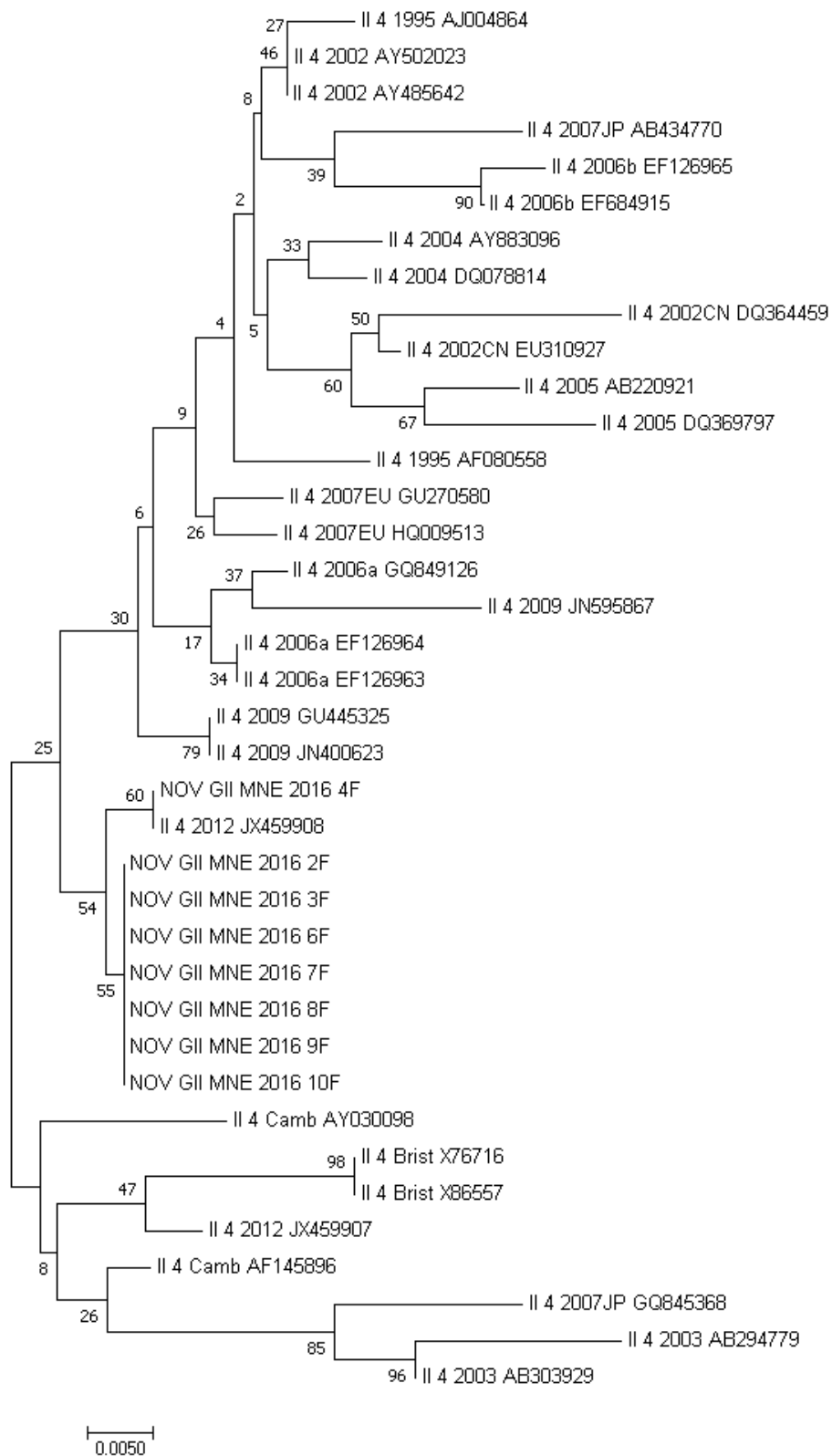
izolovane u ovom ispitivanju kao i 29 referentnih sekvenci preuzetih iz banke gena. Na stablu filograma jasno se uočava diferencijacija GI norovirusnih sekvenci.

Podela na genotipove dokazana je visokim vrednostima dobijenim metodom samoučitavanja. (Slika 21.)

Korištenjem rezultata Neighbor Joining analize izrađeno je konsezusno stablo koje prikazuje filogenetsku povezanost između 12 sekvenci GII.4 izolovane u ovom ispitivanju kao i 30 referentnih sekvenci preuzetih iz banke gena. Na stablu filograma jasno se uočava diferencijacija GII.4 norovirusnih sekvenci. Podela na genotipove dokazana je visokim vrednostima dobijenim metodom samoučitavanja. (Slika 22.)



Slika 21. Filogram NoV GI.2 dobijen „Neighbour-joining“ metodom. Skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost. Brojevi na linijama označavaju vrednosti statističke tačnosti dobijene metodom samoučitavanja (engl. *bootstrapp*).



Slika 22. Filogram NoV GII.4 dobijen „Neighbour-joining“ metodom

Rezultati filogenetske analize ukazuju na genetsku sličnost između norovirusa izolovanih u ovoj disertaciji i onih ranije opisanih u svetu. Na osnovu nukleotidne sekvence ispitanog ORF2 fragmenta sojeva NOV_GI_MNE 1, 2, 3, 4 utvrđena je sličnost od 98,1% do 99,2% sa izolatom Southampton virusa (L07418), a na nukleotidne sekvence ispitanog ORF2 fragmenta sojeva NOV_GII_MNE 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 22, 24 utvrđena je sličnost od 96,4% do 98,5% sa izolatom Hu/GII.4/sydney/NSW05 (JX459908), trenutno najrasprostranjenijem epidemijskim sojem.

5.4. Fizičko-hemijski parametri morske vode

Uzorkovanje morske vode za određivanje fizičkih parametara (temperature, saliniteta, pH, zasićenost kiseonikom) vršena je u isto vreme sa uzorkovanjem školjki i na istim lokacijama. Fizički parametri određivani su na samom mestu uzorkovanja pomoću *MultiLine* P4 WTW sonde. U Tabeli 6. prikazane su deskriptivne statističke vrednosti za temperaturu vode.

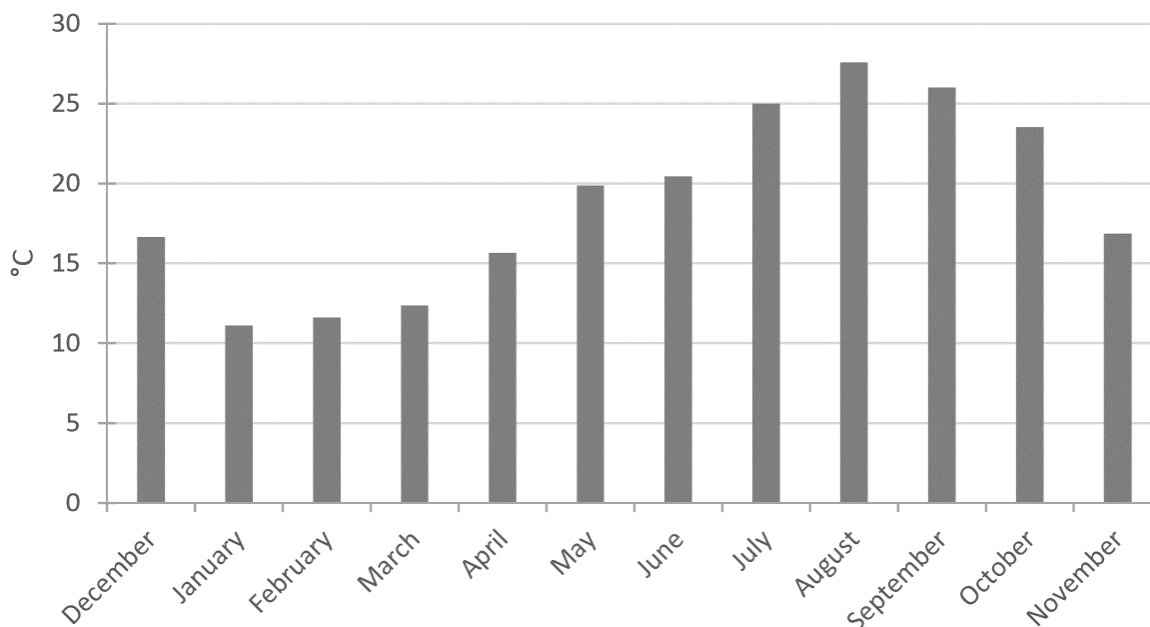
Tabela 6. Deskriptivne statističke vrednosti za temperaturu vode

	n	\bar{x}	SD	SE	CV (%)	X max	X min
Ljuta	12	18,50	6,96	2,0090	37,63	28,80	9,40
Brbat	12	18,75	5,56	1,6060	29,66	26,55	10,90
Lipci	12	18,21	6,22	1,7960	34,17	28,00	9,80
Kaldrovo	12	20,11	5,96	1,7210	29,65	28,50	11,20
Solila	12	19,79	6,09	1,7580	30,76	28,30	10,30
Sv. nedjelja	12	19,87	6,26	1,8060	31,49	30,65	11,30

Analizirajući prosečne vrednosti temperature vode, ustanovljeno je da su vrednosti u svih šest uzgajališta približne i nema većih variranja. Najniža zabeležena temperatura vode je u uzgajalištu „Lipci“ ($18,21 \pm 6,22$), dok je najviša zabeležena

temperatura vode u uzgajalištu „Kaldrovo“ ($20,11 \pm 5,96$). Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti temperatura vode po uzgajalištima ($p > 0,05$).

Na osnovu dobijenih rezultata iz prethodne Tabele 6, može se videti da prosečna temperatura vode u uzgajalištima ne pada ispod 17°C . Minimalna temperatura izmerena je u januaru $9,4^{\circ}\text{C}$, a maksimalna u Kaldrovu $28,5^{\circ}\text{C}$ u avgustu mesecu (Grafikon 3). Priliv slatkih voda unutar zaliva, kao i količina padavina značajno utiču na temperaturu vode, naročito u Kotorskom zalivu.



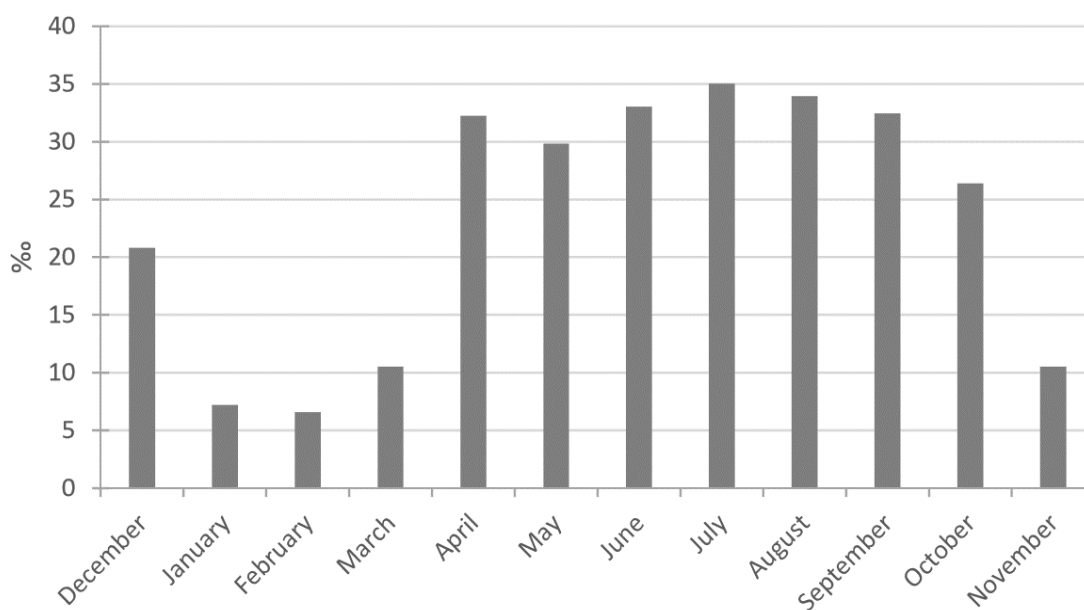
Grafikon 3. Godišnja varijacija temperature mora

Salinitet je pod uticajem različitih faktora, pre svega priliva slatke vode, padavina i morskih struja. Morske struje mogu izazvati oscilacije temperature i saliniteta. Na promene saliniteta u velikoj meri utiču vetrovi koji stvaraju struje koje donose hladniju i mnogo slaniju vodu iz dubljih slojeva mora. Kiše imaju znatno veći uticaj na promenu saliniteta površinskih slojeva, nego na temperaturu.

Tabela 7. Deskriptivne statističke vrednosti za salinitet

	n	\bar{x}	SD	SE	CV (%)	X max	X min
Ljuta	12	21,66	10,93	3,15400	50,44	32,20	3,50
Brbat	12	21,92	10,96	3,1640	50,01	33,40	4,40
Lipci	12	22,85	9,82	2,8350	42,99	33,50	8,10
Kaldrovo	12	32,16	4,27	1,2320	13,27	36,30	23,60
Solila	12	32,08	5,20	1,5010	16,21	35,80	19,70
Sv. nedjelja	12	29,89	4,96	1,4330	16,60	34,70	19,80

Statističkom analizom parametra vrednosti saliniteta u vodi, iz koje su izlovljene školjke, ustanovljeno je da je uzgajalište „Kaldrovo“ imalo najveću vrednosti (32,16±4,27), u odnosu na vrednosti zabeležene kod ostalih uzgajališa (Tabela 7). Najmanja zabeležena vrednost saliniteta je u uzgajalištu „Ljuta“ (21,66±10,93). Nisu ustanovljene signifikantne razlike između prosečnih vrednosti uzgajališta ($p > 0,05$). Kod svih šest uzgajališta ustanovljena su minimalna variranja.

**Grafikon 4.** Godišnja varijacija saliniteta mora

Različiti faktori utiču i na salinitet mora na Crnogorskom primorju. Najniže vrednosti izmerene su na lokacijama u Kotorskom zalivu, a maksimalne u Tivatskom zalivu koji je pod jačim uticajem otvorenog mora. Na Grafikonu 4. prikazano je sezonsko variranje saliniteta po mesecima.

Nije ustanovljena statistička korelacija između sezonskog pojavljivanja NoV i varijacije saliniteta.

Priliv slatke vode, kako od padavina tako i od priobalnih i podvodnih izvora, ne donosi samo hranjive soli, već i kiseonik. Zasićenost kiseonikom nema većih variranja i dostiže prosečnu vrednost i do 98,3%. Obzirom na to da vrednost kiseonikom od 100% predstavlja granicu između eutrofnih i ekstremno eutrofnih područja, ova obala spada u eutrofnu morsku sredinu.

Prosečna pH vrednost je u granicama normale za morsku vodu i kretala se od 8,14-8,18 (Tabela 8.).

Tabela 8 . Deskriptivne statističke vrednosti za pH

	n	\bar{x}	SD	SE	CV (%)	X max	X min
Ljuta	12	8,14	0,12	0,0333	1,42	8,30	8,01
Brbat	12	8,16	0,08	0,0232	0,98	8,25	8,06
Lipci	12	8,22	0,21	0,0598	2,52	8,80	8,05
Kaldrovo	12	8,16	0,06	0,0161	0,68	8,24	8,09
Solila	12	8,18	0,05	0,0152	0,64	8,26	8,11
Sv. nedjelja	12	8,15	0,04	0,0117	0,50	8,23	8,12

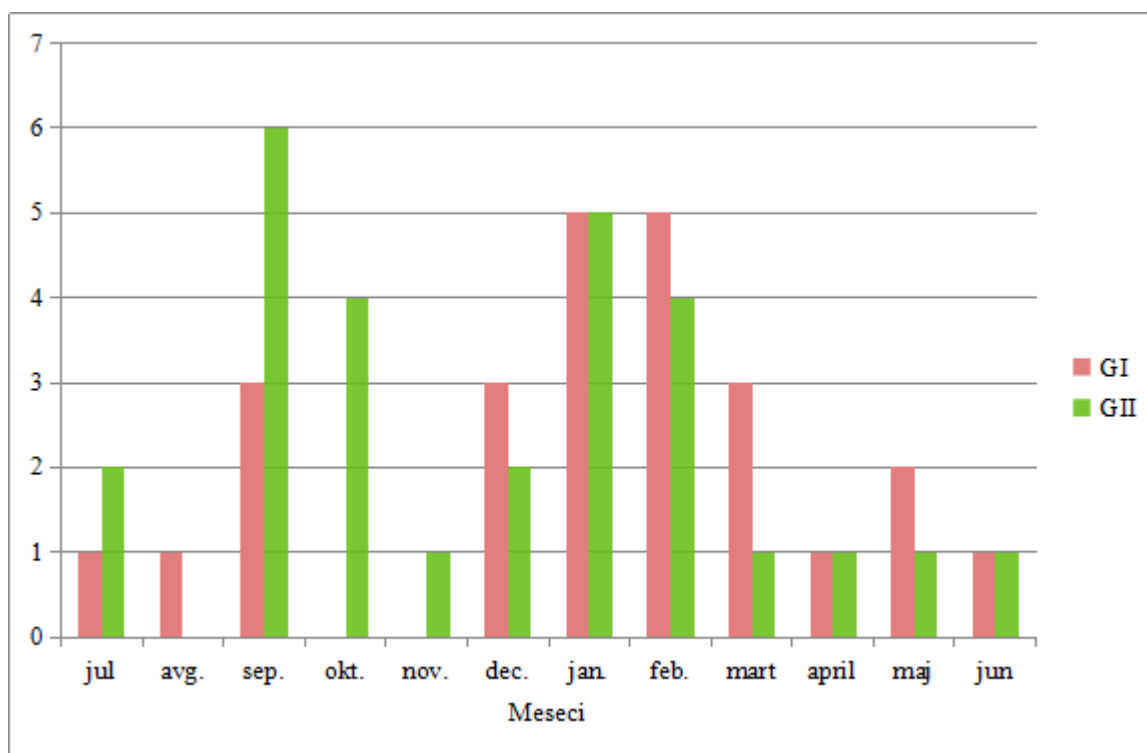
Statističkom analizom parametra vrednosti pH vode gde su gajene školjke, ustanovljeno je da je uzgajalište „Solila“ imalo najveću vrednosti ($8,18 \pm 0,05$), u odnosu na vrednosti zabeležene kod ostalih uzgajališa. Najmanja zabeležena vrednost pH je u uzgajalištu „Ljuta“ ($8,14 \pm 0,12$). Nisu ustanovljene signifikantne razlike između

prosečnih vrednosti uzgajališta ($p > 0,05$). Kod svih šest uzgajališta ustanovljena su minimalna variranja.

Takođe, nije ustanovljena statistička korelacija između sezonskog pojavljivanja NoV i sezonske varijacije rastvorenog kiseonika i pH vrednosti.

5.5. Broj pozitivnih uzoraka po mesecima - sezonska dinamika pojave norovirusa

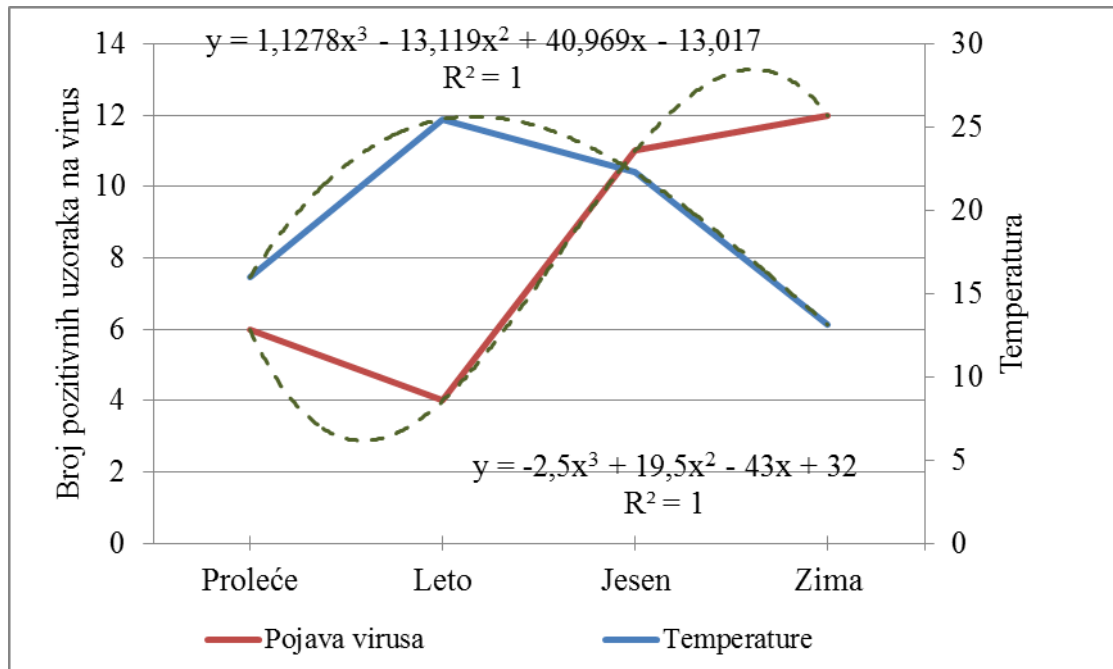
Detaljna analiza samo NoV pozitivnih uzoraka, po mesecima, pokazala da je broj pozitivnih uzoraka tokom juna, jula i avgusta, odnosno tokom letnje sezone (3 uzorka) bio značajno niži ($p < 0,05$) nego broj pozitivnih uzoraka otkrivena tokom septembra, oktobra i novembra, tj. u jesen (10 uzoraka) i tokom decembra, januara i februara, odnosno tokom zimske sezone (12 uzoraka) (Grafikon 5.). U grafikonu je takođe prikazana i zastupljenost genogrupa norovirusa.



Grafikon 5. Distribucija GI i GII po mesecima

Statističkom analizom ustanovljeno je da se sa smanjenjem temperature mora statistički značajno ($p < 0,01$) povećava pojava virusa u ispitivanim uzgajalištima. Analizirajući pojavu virusa po godišnjim dobima ustanovljena je signifikantna razlika u

toku leta ($p < 0,01$) gde se temperatura morske vode povećava, a broj pozitivnih uzoraka se smanjuje, dok u toku zimskih meseci dolazi do pada temperature vode, a broj pozitivnih uzoraka raste (Grafikon 6.).



Grafikon 6. Korelacija između pojave norovirusa u dagnjama i temperature vode tokom četiri godišnja doba

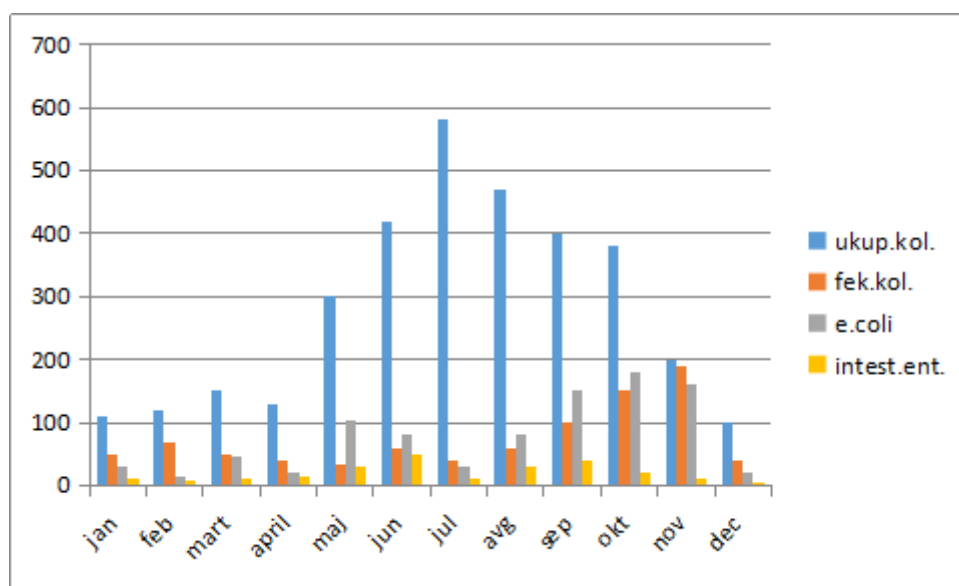
5.6. Korelacija između pojave norovirusa i mikrobioloških parametara morske vode

Mikroorganizmi, uključujući fekalne koliforme, koji se nalaze u morskoj vodi, prema odluci U.S. National Shellfish Sanitation Program-a predstavljaju indikatore prisustva virusa u tom okruženju (*Carlos i sar., 2013*). Na osnovu tog programa napisana je i Uredba o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda („Službeni list Crne Gore”, br. 2/07 od 29. oktobara 2007)

Koliformne bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* obuhvataju rodove: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, i *Escherichia*. Od ovih rodova u nefekalne bakterije spadaju: *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.* Fekalne koliformne bakterije, čiji su izvor fekalije, a primarni predstavnik je *Escherichia coli*, deo su

ukupnih koliformnih bakterija. Razdvajaju se od nefekalnih kolifoma pri temperaturi od 44.5°C.

Ispitane grupe bakterija pripadaju alohtonim mikroorganizmima (more im nije prirodno stanište). Jedan deo ovih bakterija se može akumulirati u različitim morskim organizmima, pogotovo onima koji se hrane filtracijom morske vode među kojima su školjke najvažnije. Njihova konzumacija direktno utiče na ljudsko zdravlje, stoga je monitoring morske vode uzgajališta od izuzetnog značaja.



Grafikon 7. Godišnja varijacija ispitanih grupa bakterija u morskoj vodi

Na osnovu prikazanog Grafikona 7., može se zaključiti da kvalitet vode u ispitivanim uzgajalištima u određenih periodima, uglavnom ne odgovara kvalitetu voda koje se mogu koristiti za uzgoj školjki. Većina meseca u godini ima broj ukupnih koliforma >100/100 ml morske vode, dok je broj *E.coli* i broj fekalnih koliforma uglavnom u graničnim vrednostima. Rezultati su analizirani u skladu sa Uredbom o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda (**Sl.list CG, br.2/07 od 29.oktobra 2007**), prema Članu 8. o kvalitetu voda koje se mogu koristiti za ribarstvo i

uzgoj školjki. Uočljivo je da povećano organsko opterećenje u morskoj vodi, posebno u letnjim mesecima doprinosi nezadovoljavajućem bakteriološkom nalazu..

Mikrobiološka analiza morske vode, na osnovu broja bakterija koje se u njoj nalaze, ne daje stvarnu sliku o kvalitetu vode, obzirom na to da se virus pojavljivao i u mesecima kada je voda ispinjavala kriterijime za uzgoj dagnji (<300 fekalnih koliforma i do 100 ukupnih koliforma u 100 ml morske vode).

5.7. Fitoplanktonski organizmi kao bioindikatori

Sa aspekta praćenja dinamike rasta fitoplanktona kroz sezonske cikluse moglo bi se reći da je područje Zaliva prilično dobro istraženo na mestima gde se nalaze uzgajališta školjki. Priliv nutrijenata u proleće i jesen predstavlja glavni razlog za povećanje koncentracije hlorofila *a* i brojnosti fitoplanktona (*Krivokapić i sar., 2009*). Istraživanja fitoplanktona na području Bokokotorskog zaliva ukazuju da je maksimalna srednja brojnost dijatomeja zabeležena u Kotorskom zalivu, a minimalna srednja vrednost u Hercegnovskom zalivu. Takav nalaz je i očekivan, jer se Hercegnovski zaliv nalazi pod jakim uticajem otvorenih voda (*Vuksanović, 2003*).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je brojnost fitoplanktona varirala u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine. U januaru je bila izuzetno niska i iznosila je maksimum 10^3 ćelija/L. U aprilu mesecu vrednosti su bile nešto veće i kretale su se do 10^4 ćelija/L. Ovakve vrednosti, u odnosu na skalu koja je određena na osnovu biomase fitoplanktona, karakteristične su za oligo-mezotrofno područje.

U narednom mesecu fitoplankton buja, dolazi do intenzivne deobe algi, uslovljene povišenom temperaturom vode. Maksimalna izmerena vrednost bila je u uzgajalištu Ljuta i iznosila je 1.70×10^5 ćelija/L. Ove vrednosti ostaju na istom nivou tokom celog leta, sve od septembra meseca kada dolazi do manjeg jesenjeg pika, a onda vrednosti naglo padaju do 10^4 ćelija/l. Dalji pad broja fitoplanktona zabeležen je tokom zimskih meseci, da bi tokom decembra meseca koncentracija bila najmanja.

Naši rezultati ukazuju da količina fitoplanktona ne može da bude indikator prisustva virusa u morskoj vodi. Fitoplankton u letnjim mesecima buja, dok u to vreme

koncentracija virusa u morskoj vodi opada. Samo tokom septembra meseca zabeležen je ponovni rast fitoplanktonske komponente ali i pojava virusa na svih 6 lokacija u ispitivanim uzgajalištima. Smatra se da do ove pojave dolazi zbog velike količine padavina u ovom periodu godine. U zimskom delu godine, kada imamo povećanu koncentraciju virusa u morskoj vodi i dagnjama, fitoplanktona gotovo i da nema.

5.7.1. Hlorofil *a*

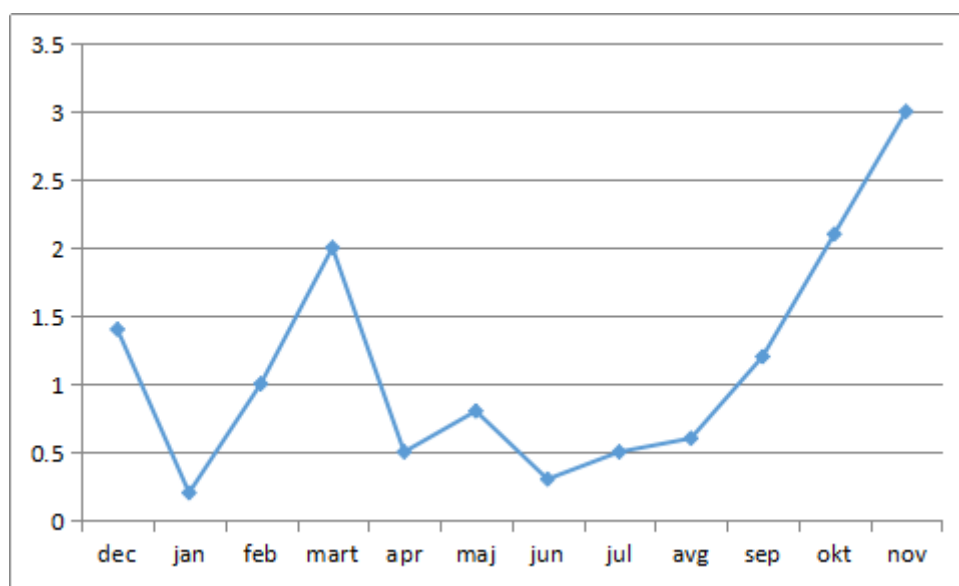
U januaru su vrednosti koncentracije hlorofila *a* bile izuzetno niske na svim ispitivanim lokalitetima, najviša vrednost dobijena je na lokalitetu Solila i iznosila je 1,027 mgm⁻³. Svi lokaliteti se mogu svrstati u mezotrofna područja prema klasifikaciji **Siokou & Pagou** (2000) specifičnoj za region istočnog Mediterana. Klasifikacija je izvršena na osnovu biomase fitoplanktona, odnosno koncentracija hlorofila *a* preko koje se on izražava i može se podeliti kao oligotrofna (- 0,100 mgm⁻³), manje mezotrofna (- 0,600 mgm⁻³), više mezotrofna (- 2,100 mgm⁻³) i eutrofna (> 2,100 mgm⁻³).

U februaru su zabeležene nešto više vrednosti u odnosu na prethodni mesec. Ovakve vrednosti koncentracije hlorofila *a* su očekivane s obzirom da je to period koji obiluje padavinama, pa se tako i pospešuje rast fitoplanktona kao posledica unosa hranljivih soli putem slatkih izvora. U tom periodu, uzgajalište Ljuta pripada eutrofnim područjima. Mart mesec karakterišu još više vrednosti koncentracije hlorofila *a*. Maksimum od 2,435 mgm⁻³ je zabeležen na lokalitetu Lipci. Svi lokaliteti, osim ovoga, pokazala su karakteristike višeg mezotrofnog područja.

U periodu od juna do septembra, uglavnom svi lokaliteti su prema dobijenim koncentracijama hlorofila *a* kategorisani kao više mezotrofna (0,100-0,600 mgm⁻³) ili manje mezotrofna (0,600-2,100 mgm⁻³) područja. U novembru su zabeležene nešto veće vrednosti hlorofila *a*, što i nije neočekivano, s obzirom na veliku količinu padavina u tim mesecima, pa veća količina slatke vode dospeva u zaliv a sa njom i hranjive soli što sve zajedno pospešuje primarnu produkciju u zalivu. Najveća koncentracija hlorofila *a* utvrđena je na lokalitetu Brbat i iznosila je 4,540 mgm⁻³.

Na grafikonu 8. prikazana je sezonska varijacija koncentracije hlorofila *a* po mesecima.

Na osnovu ovih podataka, zaključeno je da koncentracija hlorofila *a* nema direktnog uticaja na pojavu i otpornost virusa u ispitivanim uzgajalištima i da ne može da bude indikator pojave virusa u morskoj vodi.



Grafikon 8. Godišnja varijacija hlorofila *a* u morskoj vodi

5.8. Pojava norovirusa i njegova korelacija sa brojem bakterija indikatora fekalnog zagađenja (*E.coli*) u dagnjama

Najverovatniji broj *E.coli* u dagnjama, koje su predstavljale uzorke za ispitivanje virusa prikazan je u Tabeli 9. Broj bakterija kretao se od < 18 pa sve do > 18.000 MPN/100 g mesa i međuljuštune tečnosti dagnje. Najviši zabeležen nivo bio je u uzgajalištu Solila, u Tivatskom zalivu, gde je izmeren broj veći od 18.000 MPN/100 g u novembru 2015.godine.

Ukupno 48 od 72 ispitana uzorka bila su iz uzgajališta koja pripadaju klasi A, odnosno imaju prihvatljiv broj bakterija koji je propisan evropskim standardom (<230

MPN/100 g) (**Reg EC 854/2004**). Ostala 24 uzorka prikupljena su iz oblasti koja se klasifikuju kao klasa B jer je broj bakterija *E.coli* u dagnjama iz tih oblasti veća od dozvoljenog i dagnje se ne smeju konzumirati sirove, bez prethodne obrade.

Tabela 9. Najverovatniji broj bakterija *E.coli* u dagnjama sa uzgajališta iz kojih su uzimani uzorci

Mesec/Go dina	REZULTATI U PROIZVODNIM ZONAMA (<i>E.coli</i> MPN/100 g)					
	M1 Ljuta	M2 Brbat	M3 Lipci	M4 Kalardovo	M5 Solila	M6 Sv.nedelja
VII/2015	20	< 18	< 18	45	130	< 18
VIII/2015	20	20	20	< 18	20	45
IX/2015	20	68	45	68	170	460
X/2015	20	110	490	490	1.300	< 18
XI/2015	220	78	700	330	>18.000	790
XII/2015	< 18	1.300	78	130	230	5.400
I/2016	< 18	< 18	20	20	330	940
II/2016	78	2.400	490	45	260	700
III/2016	45	130	45	490	330	330
IV/2016	20	< 18	20	< 18	16000	< 18
V/2016	110	68	310	330	78	490
VI/2016	130	18	230	490	45	45

Godišnja statistička analiza uzoraka, koji potiču iz ovih proizvodnih oblasti, ukazala je da su područja češće kategorizovana kao klasa A u proleće ($p < 0,05$) i leto ($p < 0,01$), u odnosu na jesen i zimu ($p > 0,05$) (Tabela 10.).

U uzorcima koji imaju < 230 MPN/100 g *E. coli* i zadovoljavaju kriterijume, 31,2% uzoraka je bilo pozitivno na norovirus (15/48 uzorka). Naši rezultati ukazuju da školjke mogu biti sredstvo za prenos norovirusa čak i kada je broj *E. coli* ispod propisane granice bakterijskog rizika i da ne mogu biti indikatori pojave virusa u dagnjama.

Tabela 10. Komparativna analiza sezonske varijabilnosti broja *E. coli* i prevalencije norovirusa

Godišnje doba	χ^2/p vrednosti	
	<i>E. coli</i> (A / B)	NoV (Pozitivni/Negativni)
Zima	0,23	0,00067**
Proleće	0,03 *	0,00001**
Leto	0,00**	0,00000**
Jesen	0,23	0,23013

Statističke značajnosti: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

6. DISKUSIJA

Virusi koji se prenose hranom, naročito norovirus kao jedan od vodećih patogena u poslednjoj deceniji, zauzimaju značajno mesto u analizi rizika sa aspekta bezbednosti hrane i poprimaju sve veću popularnost kako u naučnim krugovima, tako i među potrošačima i proizvođačima hrane. Tome doprinosi i činjenica da je Srbija, kao zemlja koja nema izlaz na more, veliki uvoznik morskih plodova iz susedne Crne Gore. Morski plodovi, a naročito dagnje, koje se hrane filtracijom morske vode, su organizmi koji mogu da akumuliraju patogene prisutne u morskoj vodi i samim tim predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi. U poslednje vreme raste stopa potrošnje ove vrste namirnica. S obzirom na to, da po postojećim Pravilnicima o bezbednosti hrane, u zemlji iz koje se dagnje uvoze na teritoriju naše zemlje, nije obavezno vršenje analiza na prisustvo virusa, a da oni mogu biti prisutni u velikim količinama u dagnjama, cilj ove disertacije bio je da detektujemo virus i da smanjimo eventualni rizik po potrošače, kao i da odredimo koji su to potencijalni faktori koji mogu da utiču na njegovu pojavu u ovoj namirnici.

Norovirus može biti prisutan u vrlo niskim količinama u dagnjama, pa je neophodna i vrlo osetljiva metoda detekcije. Pored toga što su ovo prvi nalazi norovirusa u proizvodnim područjima dagnji u Crnoj Gori, prikazani rezultati donose i nova saznanja iz oblasti molekularnih metoda koje se koriste u detekciji virusa.

Bokokotorski zaliv se nalazi u jugoistočnom delu Jadranskog mora i ukupne je površine oko 87 km². Uzgajališta iz kojih su dagnje izlovljene, koriste sistem mrežnih bazena i imaju jako dobar položaj jer su u blizini izvora slatke vode koja utiče na smanjenje saliniteta. Ovaj zaliv, kao i ostala područja Mediterana je pod velikim uticajem antropogenog faktora i aktivnosti koje se odvijaju na njegovoj obali.

Poslednjih decenija evidentna je sve veća urbanizacija i industrijalizacija, koja je dovela do zagađenja životne sredine, naročito morske vode u zalivu, za koju je karakteristično slabo strujanje i cirkulacija sa otvorenim morem. Slabo cirkulisanje vode može dovesti do eutrofikacije i moguće višeg cvetanja algi, koje ne moraju da budu

toksične, ali mogu da dovedu do nepovoljnih uslova (npr. nizak nivo kiseonika zbog propadanja algi).

Zaliv je zagađen otpadnim vodama, koje čine oko 0,2% ukupnog sadržaja vode. Najveću opasnost predstavljaju kanalizacioni sistemi, jer su postojeće mreže u izuzetno lošem stanju. Ova regija je poznata kao područje sa najvećom prosečnom količinom padavina u Evropi, pa udeo atmosferskih padavina koje dospevaju u more nije zanemarljiv.

Proizvodnja dagnji u Crnoj Gori kreće se oko 200 tona godišnje i ima tendenciju rasta. Tehnologija branja koja se primenjuje poprilično je zastarela, mreže se često ne postavljaju pravilno, što pak dovodi do nižih prinosa od očekivanih. Školjke, kao filtracioni organizmi, imaju sposobnost da apsorbuju različite patogene koje na razne načine dospevaju u morsku vodu i zato predstavljaju pogodan indikator za analizu kvaliteta morske vode. Na metabolizam i životni ciklus ovih organizama potencijalno veliki uticaj imaju i fizičko-hemijski parametri morske vode (temperatura, pH, O₂, salinitet), biološki faktori i drugi uslovi životne sredine. Morska voda i fitoplankton predstavlja hranu za školjke i zato je neophodno pratiti uticaj svih navedenih faktora i utvrditi da li oni zaista imaju uticaj i na pojavu i opstanak virusa u ovim organizmima. Na bioakumulaciju i opstanak NoV u školjkama utiče koncentracija virusa u okolini, metabolička aktivnost školjke i efekti tretmana nakon izlovljavanja koje se primenjuju na školjke (*Campos i Lees, 2014*). Virusne čestice dugo opstaju u morskom okruženju i mogu se prenositi i na velike udaljenosti (> 10 km) što predstavlja mogući rizik za područja proizvodnje školjki (*Winterbourn i sar., 2016*).

U našoj zemlji, usled nedovoljnih i neujednačenih laboratorijskih mogućnosti, epidemiološka situacija virusnih bolesti prenosivih hranom je još uvek nedovoljno poznata. Epidemije se registruju na području Beograda od 2010. godine, od kada su u Centru za mikrobiologiju Gradskog zavoda za javno zdravlje (GZZJZ) uvedene laboratorijske metode za detekciju ovih uzročnika u uzorcima fecesa. U periodu od 2011. do 2015. godine u Beogradu je registrovano 8248 osoba obolelih od 17 različitih crevnih zaraznih bolesti i zoonoza koje se dominantno prenose hranom.

Poslednjih godina, zahvaljujući primeni vakcine protiv rotavirusa u nekim zemljama sveta, on se polako povlači sa vodećeg mesta izazivača dijareja kod dece i ustupaju ga norovirusima (*Ramani i sar., 2014*). Smatra se da je jedan deo dece sa registrovanom dijarejom i gastroenteritisom u Beogradu u periodu 2011-2015. godine, imao neku od opisanih infekcija virusne etiologije sa blažom kliničkom slikom, ali je izostalo upućivanje na laboratorijsku dijagnostiku, ili su podaci o obavljenim analizama urađeni van laboratorije GZZJZ i ostali neprijavljeni. U posmatranom petogodišnjem periodu u Beogradu su registrovane 172 epidemije crevnih zaraznih bolesti sa 2072 obolele osobe. Među njima prijavljeno je 17 epidemija bolesti virusne etiologije, od kojih su 9 opisane kao najverovatnije alimentarne i za 8 se smatra da je infekcija prenošena kontaktom.

S obzirom da virusi mogu biti prisutni u hrani u vrlo malim količinama, a da predstavljaju rizik za potrošače, neophodna je osetljiva metoda detekcije. Real Time PCR je jedina osetljiva metoda dovoljna za direktnu detekciju niskog nivoa kontaminacije kakav je slučaj sa uzorcima dagnji, te je izabrana za “zlatni standard” za ispitivanje norovirusa u namirnicama (*Lees, 2000*). Uprkos značajnim naporima, NoV ne može biti pouzdano kultivisan in vitro (*Jones i sar., 2015*).

Poznato je da uzorci hrane sadrže veliku količinu inhibitornih supstanci i predstavljaju izazovan matriks za pouzdanu RT-qPCR kvantifikaciju, pa je povećan rizik od lažno negativnih rezultata (*Scipioni i sar., 2008*). Tokom razvoja metode, uočeno je da se virus, najvećim delom, koncentriše u digestivnoj žlezdi dagnje (*Atmar i sar., 1995; Schwab i sar., 1998*). I najnovija istraživanja potvrđuju da se norovirus specifično vezuje za digestivnu žlezdu, koja sadrži manje inhibitornih supstanci od ostalih tkiva. Vezivanje za digestivnu žlezdu može se objasniti tako što virus ima tendenciju vezivanja za kanale da bi izbegao razlaganje u digestivnom traktu (*Le Guyader i sar., 2012*). Iz ovih razloga, uzorak za naša ispitivanja bila je upravo digestivna žlezda dagnje.

Poređenje metoda ekstrakcije pokazalo je da je digestija korišćenjem proteinaze K, nakon čega sledi ekstrakcija NucliSENS miniMag, najefikasnija metoda za prikupljanje virusne RNK (*Uhrbrand i sar., 2010*).

U eksperimentu je korišćena standardna metoda za detekciju norovirusa u hrani, odobrena od Evropske komisije za standardizaciju (engl. *European Committee for Standardization*, CEN) koja je objavljena 2013. godine kao ISO/TS 15216-1:2013 (E) – *Horizontalna metoda za detekciju Hepatitis A virusa i Norovirusa u hrani primenom RT-PCR u realnom vremenu*. Međutim, otkrivanje virusne RNK u uzorku ne pruža informacije o infektivnosti virusnih čestica iz kojih potiču, te je stoga teško proceniti stvarni rizik po zdravlje ljudi.

Rezultati našeg istraživanja predstavljaju prve dokaze norovirusa na ovom proizvodnom području za uzgajanje dagnji, a u skladu su sa većinom rezultata drugih istraživača o rasprostranjenosti norovirusa u celom svetu (*Cheng i sar., 2005; Bellou i sar., 2013*). Prevalenca norovirusa u dagnjama dobijena u našem ispitivanju, koje je rađeno tokom godinu dana, odnosno tokom sva 4 godišnja doba, bila je 43%, što je mnogo više u poređenju sa ostalim studijama koje su rađene na nekim od drugih obala u Jadranskom moru.

Ispitivanja su vršena na teritoriji Italije, Slovenije, Hrvatske, Albanije gde je rasprostranjenost virusa u svim zemljama bila oko 10% (*Bella i sar. 2016, Croci L. i sar. 2007, Škoro i sar. 2015, Henigman i sar. 2015, Terio i sar. 2014*). Rezultate slične našim, dobili su istraživači iz Španije (*Polo i sar. 2015*), a mnogo veća prevalenca zabeležena je u Velikoj Britaniji, koja je iznosila čak 76,2% (*Lowther i sar., 2012*).

Podatke o prevalenciji je teško uporediti, jer nije uvek primenjena ista metodologija (*EFSA, 2012*), a razlike mogu da nastanu i zbog perioda obuhvaćenog istraživanjem. Negde su obuhvaćeni samo određeni meseci u godini, pa je moguće da je ukupna prevalencija i manja od dobijene. U našem istraživanju, samo tokom avgusta nismo zabeležili pozitivne uzorake na prisustvo NoV.

Od ukupno 72 kompozitna uzorka dagnji u našem istraživanju, norovirus je detektovan u 31 uzorku. Što se tiče rasprostranjenosti genogrupa, GII genogrupa je detektovana u više uzoraka, nego GI genogrupa (54,8% prema 12,9%), dok je kod 10 (32,3%) uzoraka utvđeno istovremeno prisustvo norovirusa obe genogrupe (GI+GII). Ovi rezultati su u skladu sa većinom rezultata dobijenih u studijama drugih autora

(Suffredini, 2014; Pavoni i sar., 2013; Rodriguez-Manzano i sar., 2014, Bella i sar., 2016). U istraživanjima Matthews i sar. (2012) ustanovljeno je da su epidemije uzrokovane GII sojem bile najučestalije (75%), dok je sa GI genogrupom bilo uzrokovano dosta manje epidemija (13%). Obe genogrupe, GI i GII, bile su zastupljene u 12% epidemija uzrokovane norovirusom. Slične rezultate dobio je Vega (2014) kada je NoV GII genogrupu otkrio u 89%, a GI genogrupu u 11% ispitanih uzoraka sa područja Sjedinjenih Američkih Država u period između 2009-2013. godine. Lopman je 2008. godine objavio da je više od 95% zabeleženih slučajeva bilo prouzrokovano GII genogrupom.

Sa druge strane, neki istraživači objavili su potpuno suprotne rezultate, jer su dobili veći broj GI pozitivnih uzoraka (Le Guider i sar. 2009; Lowther i sar. 2012; Polo, 2015).

Uzroci visoke prevalencije NoV GII genogrupe još uvek nisu poznati. U nekim studijama se pominju razlike u biološkim osobinama kao što su virulentnost, putevi prenošenja ali i stabilnost virusa u životnoj sredini (Crocchi i sar. 2007, Siebenga i sar. 2009). Druge studije zaključuju da je veća prevalencija NoV GII genogrupe posledica drugačijeg afiniteta za tkiva školjke koja mogu uticati na sposobnost bioakumulacije u školjkama (Suffredini i sar., 2011; Comelli i sar., 2008). Osim toga, to može biti posledica većeg prisustva norovirusne GII genogrupe u ljudskoj populaciji, što se objašnjava njihovom sposobnošću da prepoznaju širi spektar receptora, tj. histo-krvne grupe antigena (HBGA) (Lindesmith i sar., 2012) od drugih norovirusnih grupa.

U cilju potvrde identifikacije virusne RNK pronađene u ispitivanim uzorcima u našem istraživanju, kao i analize stepena sličnosti sa sekvencama virusa uskladištenih u „GenBank“ - genskoj bazi podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>), izvršeno je sekvenciranje delova virusnih genoma. Sekvenciranje i filogenetska analiza ispitivanih virusa izvršena je u cilju utvrđivanja stepena sličnosti u nukleotidnom sastavu RNK izolata iz Crne Gore sa sekvencama iz Evrope i drugih delova sveta.

Ukupno 17 proizvoda RT qPCR reakcije sa fragmentima ORF2 region Norovirusa (330 bp za genogrupu GI i 340 bp za genogrupu GII), prečišćeno je komercijalnim kitom Minielute, Qiagen i Sephadex, Sigma kolonama, prema

dokumentovanim uputstvima proizvođača, i na taj način proizvodi su pripremljeni za sekvenciranje.

Sekvenciranje je urađeno metodom po Sangeru. Metoda direktnog sekvenciranja po Sangeru, smatra se zlatnim standardom za sekvenciranje uprkos činjenici da je u upotrebi već četvrta generacija sekvenciranja koje se bazira na potpuno različitim i novim tehnologijama (*Gužvić i sar., 2013*). Sekvenciranje koje je izvršeno uz korišćenje prajmera za ORF2 region norovirusa, obavljeno je u kompaniji GATC Biotech u Nemačkoj, primenom iste metode direktnog sekvenciranja po Sangeru. Poznato je da, pored mogućnosti simultane kontaminacije školjkaša norovirusima sa dva ili više sojeva različitih genogrupa, u samom laboratorijskom radu, može doći do unakrsnih kontaminacija koje dodatno otežavaju sekvenciranje, jer se tada ne može precizno pozicionirati svaki nukleotid zbog preklopljenih pikova nukleotida različitih sojeva na elektroforegramu, što onemogućava dobijanje sekvenci sa očekivanim rasporedom nukleotida za prethodno navedene sekvence norovirusa.

Dobijene sekvence poređene su sa ekvivalentnim sekvencama iz Genbank baze gena, uz primenu BLAST softvera, ubacivanjem naših sekvenci u program za dobijanje nukleotidne homologije. BLAST program je softver koji omogućava poređenje rasporeda nukleotida ispitivane sekvence sa ostalim sličnim sekvencama koje su registrovane u bazi gena i pokazuje procenat međusobne nukleotidne homologije.

Proteklih nekoliko godina uočen je sve veći broj RT-qPCR pozitivnih uzoraka koji su dali negativan rezultat korišćenjem prajmera za amplifikaciju sekvence ORF2 regiona, što upućuje na potrebu promene specifičnih oligonukleotidnih prajmera za sekvenciranje (*Van Beek i sar., 2014*). Trenutno se okviru NORONET-a (<http://www.noronet.nl>) ulaže napor na razvoj novih prajmera za sekvenciranje dužine 1200 bp i 1100 bp, koji pokrivaju oba ORF-a, što bi trebalo da omogući bolju tipizaciju.

Filogenetskom analizom amplifikovanog segmenta početnog dela ORF2 ukupno smo dokazali prisustvo četiri genotipa GI.2, jednog genotipa GII.2 i dvanaest genotipova GII.4. Na osnovu nukleotidne sekvence ispitanog fragmenta ORF2 sojeva NOV_GI_MNE 1, 2, 3, 4 utvrdili smo sličnost od 98,1% do 99,2% sa izolatom

Southampton virusa (L07418) (*Lambden i sar, 1993.*), epidemijskog soja karakterističnog za širenje vodenim putem.

Na osnovu nukleotidne sekvence ispitanog fragmenta ORF2 sojeva NOV_GII_MNE 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 22, 24 utvrdili smo sličnost od 96,4% do 98,5% sa izolatom Hu/GII.4/sydney/NSW05 (JX459908), trenutno najrasprostranjenijem cirkulirajućim epidemijskim sojem.

Uprkos velikom broju genotipova i genetičke raznovrsnosti norovirusa (*Kroneman i sar., 2013.*), virusi jednog genotipa, GII.4, odgovorni su za većinu epidemija i sporadičnih slučajeva gastroenteritisa širom sveta (*Siebenga i sar., 2009.*), dok je GI genotip često otkriven u epidemijama izazvanim hranom i vodom (*Vinje, 2015.*). Tačkastim mutacijama i genetskim rekombinacijama kontinuirano se stvaraju novi sojevi GII.4 genotipa norovirusa (*Green, 2013.*). Od sredine devedesetih, sedam različitih GII.4 varijanti su se sukcesivno pojavljivale svake 2-3 godine, zamenjujući prethodne dominantne varijante, a neke od varijanti GII.4 povezani su sa globalnim epidemijama gastroenteritisa (*Vinje, 2015.*).

Od svih do sad prijavljenih sekvenci 91% spada u GII genogrupu, a najučestaliji su ORF1 genotipovi GII.P4, GII.Pe, GII.P7 i ORF2 genotipovi GII.4, GII.6, GII.3 (*Van Beek i sar., 2014.*). Prema zaključcima iz NORONET grupe, 2014. godine je po prvi put GII.Pe premašio GII.P4. To je povezano s pojavom GII.4 Sydney 2012 ORF2 varijante, koja je u 2013. godini zamenila već postojeću GII.4 New Orleans 2009 ORF2 arijantu (*Van Beek i sar., 2014.*). Tokom zime 2012.-2013. godine u Italiji je zabeležena pojava norovirusne infekcije kod 28,9% dece hospitalizovane zbog gastroenteritisa, a tipizacijom je utvrđeno da se radi o GII.4 Sydney 2012 novoj cirkulišućoj varijanti, koja je prikazala promene epidemiologije NoV zabeležene na globalnom nivou. (*Giammanco i sar., 2013.*). Na istoj teritoriji je i nekoliko godina kasnije detektovana ista genogrupa što ukazuje na to da sekvence NoV verno odražavaju epidemiološku situaciju na lokalnoj teritoriji (*Bella, 2016.*). Međutim, između 2009. i 2013. godine, nekoliko ne-GII.4 sojeva (GII.12, GII.1, GI.6) su takođe kružile zajedno sa pretežnim virusima GII.4 (*Vinje, 2015.*).

Uprkos utvrđenim razlikama u sposobnosti NoV GI i GII da izazovu bolest različitim putevima infekcije, još uvek nije poznata definitivna količina infektivne doze norovirusa za svaku genogrupu, tako da je prilikom procene kriterijuma za bezbednost potrebno sagledati ukupnu količinu (NoV GI i GII) (EFSA, 2012.), što je najbolji način upravljanja rizikom. U našoj studiji dobijeni rezultati pokazuju da se čak u 32,3% uzorka pojavljuju obe genogrupe norovirusa. U Velikoj Britaniji norovirus je otkriven u 76,2% ispitanih uzoraka školjke. Od ovih, GI je otkriven u 20,9%, GII je otkriven na 7,7%, a GI i GII su otkriveni u čak 47,6% ispitanih uzoraka (Lowther i sar. 2012; CEFAS, 2014).

Podaci iz naučnih epodemioloških istraživanja ukazuju na to da postoji suštinski rizik od pojave bolesti kada koncentracija virusa prelazi 2000 cpg (virusnih kopija/ g digestivne žlezde), a neke epidemije su se javljale i pri vrednostima od 1000 cpg (Lowther i sar., 2010). Na osnovu tih podataka, jasno je da, dagnje sa koncentracijom virusa manjom od 150 cpg ne mogu da dovedu do pojave bolesti kod ljudi. Trenutni savet Instituta za biologiju mora čija je zvanična laboratorija akreditovana za ovaj test je da pouzdana granica treba da bude 200 cpg.

Slično prethodnim studijama (Le Guyader i sar., 2003; Lowther i sar., 2008; Suffredini i sar. 2012; Bazzardi i sar. 2014, Bella i sar., 2016), i u našoj je ustanovljeno da se norovirus sezonski pojavljuje u dagnjama, sa većom učestalošću tokom zimskih meseci. Moguća objašnjenja uključuju veću otpornost virusa usled niskih temperatura, manje UV svetlosti, na koju su norovirusi osetljivi, česte padavine i povećane cirkulacije virusa u humanoj populaciji, turizam i veća konzumacija morskih plodova (Lowther i sar. 2012). Smatra se i da dagnje imaju ubrzani metabolizam tokom letnjih meseci, u toplijim vodama, pa da se virus kraće u njima zadržava, dok je zimi sporiji pa se akumulira veća količinu virusa (Hernroth i Allard, 2007). Uzgajališta dagnji nalaze se uz obalu, pa su pod uticajem mnogih ekoloških faktora, zemljišta, slatkovodne i morske sredine.

U studiji Lowther i saradnika (2012) najveći broj pozitivnih uzoraka dobijen je u februaru (100%), a najmanji u septembru (47%), za razliku od naših rezultata gde je maksimalan broj pozitivnih uzoraka dobijen u septembru (100%). Ovaj rezultat nije

neočekivan, s obzirom na veliki broj kišnih dana u ovom mesecu na našem ispitivanom području.

Iako epidemije dominiraju uglavnom tokom zimskih meseci, one u leto ne nestaju (*Lopman i sar., 2008*). Primer za to je epidemija koja je zabeležena u Španiji, gde je statistički značajno veća pojava virusa tokom letnjih meseci, odnosno od aprila do septembra ($p < 0.0001$) u odnosu na hladnije mesece, od oktobra do marta (*Polo i sar., 2015*). U našoj studiji se virus takođe pojavljivao tokom svih meseci u godini, osim avgusta.

Različite vrste školjkaša mogu imati različiti intenzitet filtracije iako su gajene pod istim uslovima. Faktori životne sredine koji mogu imati uticaj na filtraciju školjki jesu temperatura, salinitet, rastvoreni kiseonik, pH i dr. Čak i predstavnici iste vrste mogu različito da se ponašaju pod istim uslovima. Zato je jako teško predvideti efekat ovih faktora ili vremenskih uslova na stopu akumulacije virusa u dagnjama.

Istraživanjem je utvrđeno da su mikroorganizmi fekalnog porekla, koji dospeju u more, izloženi značajnom stresu, koji je rezultat nagle promene uslova u moru, u odnosu na uslove koje su imali u digestivnom traktu domaćina (niža temperatura, povećan salinitet, manje hranljivih materija). Takođe se dokazalo da se one mogu adaptirati na te uslove. Na preživljavanje patogenih mikroorganizama koji putem otpadnih voda dospevaju u morsku sredinu utiče čitav niz činioca, od kojih su najvažniji svetlost (sunčevi zraci), temperatura, salinitet, pH, rastvoreni kiseonik i dr.

Jadran ima dosta visoki salinitet, ali je vrednost saliniteta niža u odnosu na istočni Mediteran. U južnom Jadranu voda je većeg saliniteta nego u severnom, koji je pod većim uticajem slatke vode dospele u more putem reka. Virusi mogu u morskoj vodi da opstanu duže od bakterija i svoju infektivnost mogu da održe i nekoliko nedelja. Prosečni salinitet morske vode je varirao tokom perioda našeg istraživanja, a alohtonim mikroorganizmima je najpovoljniji oko 9‰. Ova značajna razlika može da dovede do inaktivacije mikroorganizama, koja se odvija kroz osmotski šok ili specifičnu toksičnost jona. U uslovima malog variranja saliniteta, ovaj činilac nije od veće važnosti za preživljavanje mikroorganizama (*Šolić i Krstulović, 1992*). Isti rezultati dobijeni su i u

našoj studiji, gde je salinitet varirao od 21-32‰ i gde nije imao uticaj na pojavu norovirusa.

U okruženju, crevni virusi mogu preživeti u širokom opsegu pH (pH 3 do 10) i na jako niskim temperaturama (*Kocwa-Haluch, 2001*). U nekoliko studija, utvrđeno je da se virusi češće javljaju pri nižim temperaturama i tako opstaju duže u prirodnim sredinama (morskoj vodi, rekama i podzemnim vodama) (*Green, 1999; Lipp, 2001; Lipp, 2002*).

U veštačkoj morskoj vodi, virusi su detektovani pomoću RT-PCR i više od 60 dana na temperaturama od 22°C, ali samo 30 dana pri 30°C (*Wetz i sar., 2004*). S obzirom na to, da su se pH vrednosti morske vode, uzorkovane na ispitivanim područjima, u toku godinu dana kretale u u granicama normale (prosečno od 8,14-8,18), nije ustanovljena statistička korelacija između sezonskog pojavljivanja NoV i sezonske varijacije pH vrednosti, koja u ovom slučaju nije bila velika.

Procena kvaliteta i zdravstvene bezbednosti školjki regulisana je evropskom Uredbom o higijeni hrane 854/2004. Redovni monitoring proizvodnih područja za uzgoj dagnji, podrazumeva praćenje nivoa bakterija, indikatora fekalnog zagađenja, radi sprečavanja konzumacije virusima kontaminiranih školjki, a trenutno ne uključuje kontrolu prisustva virusa u dagnjama. Evropska regulativa 853/2004 propisala je određena pravila koja se odnose na dozvoljeni nivo ovih bakterija u dagnjama. Na osnovu te regulative, dagnje iz proizvodnih područja koja pripadaju A kategoriji (<230 *E.coli*/100 g mesa i međljuštularne tečnosti) mogu se konzumirati sirove, dagnje iz uzgajališta koja pripadaju B kategoriji (<4,600 *E.coli* /100 g mesa i međljuštularne tečnosti) moraju da prođu procese prečišćavanja, dok dagnje iz uzgajališta C kategorije (<46,000 *E.coli*/100 g mesa i međljuštularne tečnosti) moraju biti na dugoročnom prečišćavanju, ili termički obrađene.

Ukoliko dobije rezultate značajnog fekalnog zagađenja, ili nalaza norovirusa, nadležni organ može zatvoriti područje proizvodnje školjki. Ponovno otvaranje proizvodnog prostora sledi kada rezultati budu u skladu sa zahtevima standardima za dozvoljeni broj *E. coli* u dagnjama. Međutim, iz područja proizvodnje školjki koje su ponovo otvorene u ovim okolnostima prijavljene su NoV epidemije (*EURL, 2014*). U

SAD minimalni period zatvaranja uzgajališta je 21 dan (*NSSP 2013*), dok je u Francuskoj 28 dana uz konstantne negativne rezultate na prisustvo virusa i kontrolisane bakterijske indikatore (*CEFAS, 2014*).

Nekoliko studija ukazuje na to da ovi bakterijski standardi ne pokazuju adekvatan rizik od virusa koji se prenose školjkama, uključujući viruse poput adenovirusa, rotavirusa, astrovirusa, norovirusa, enterovirusa i hepatitisa A (*Lees, 2000; Jiang i sar., 2001; Fong and Lipp, 2005; Shin i sar., 2013*). Ove studije podupiru pretpostavku da bakterijski parametri (fekalni indikatori) sami po sebi nisu dovoljni za identifikaciju i prisustvo crevnih virusa u školjkama. Takođe, dokazuju prisustvo norovirusa u dagnjama koje su imale nivo *E. coli* ispod regulatornih ograničenja. **Campos i Lees** su 2014. godine objavili nekoliko mogućih razloga zbog kojih dolazi do ove pojave. Jedan od njih je taj što se virusi drugačije ponašaju u ćeliji domaćina i u okruženju, zatim različit je stepen inaktivacije virusa i bakterija tokom tretmana otpadnih voda i na kraju drugačija je kinetika eliminacije virusa i bakterija iz organizma dagnje. Pored toga, norovirusi vode poreklo isključivo iz fecesa ljudi, dok *E.coli* može dospeti u životnu sredinu i iz ljudskog i životinjskog fecesa.

Naši rezultati ukazuju da školjke mogu biti sredstvo za prenos norovirusa čak i kada je najverovatniji broj *E. coli* ispod propisane granice. U čak 15 uzoraka u kojima je broj *E.coli* bio manji od 230 MPN/100 g (uzgajalište A klase) ustanovljen je norovirus.

Ovi nalazi ukazuju na potencijalnu potrebu da se revidiraju kriterijumi bezbednosti za uzgajališta školjki i uključivanje virusnog indikatora bi bilo značajno za javno zdravlje i za ekonomski prosperitet. Pokazalo se da upotreba jednog fekalnog indikatora za klasifikaciju proizvodnih područja za uzgoj školjki nije adekvatna za procenu rizika po javno zdravlje ljudi.

Problem fekalnog zagađenja prisutnog i u priobalnim vodama, takođe ima uticaja na sanitarni kvalitet organizama koji u tom području žive. Jedan deo ovih bakterija se može akumulirati u različitim morskim organizmima, pogotovu onim koji se hrane filtracijom morske vode, među kojima su školjke najvažnije. Budići da školjke, pogotovu *Mytilus galloprovincialis* imaju značajnu ulogu u ljudskoj ishrani važno je ispitati koncentraciju potencijalnih bakterija u morskoj vodi na uzgajalištima. Naša

ispitivanja nisu pokazala vezu između pojave norovirusa u dagnjama i količine bakterija u morskoj vodi. Došlo se do zaključka da broj bakterija *E.coli* u morskoj vodi prati broj bakterija *E.coli* u dagnjama, što ukazuje na veliku moć dagnji da akumuliraju patogene iz svog okruženja.

S obzirom na to da su virusi koji se nađu u morskoj vodi jedna od grupa organizama koje čine plankton, pored bakterija, cijanobakterija, algi, gljiva, protista i metazoa (**Reynolds, 2006**), želeli smo da ispitamo da li postoji zavisnost između virusne prevalencije i gustine fitoplanktonske komponente, koja ujedno predstavlja i hranu za školjke.

Sastav fitoplanktona veoma varira i prostorno i vremenski, a zavisi od kompleksa abiotičkih i biotičkih ekoloških faktora u nekom vodenom sistemu. Kvantitativne i kvalitativne promene u sastavu fitoplanktona predstavljaju “odgovor” zajednice na promene ekoloških faktora.

Najvažnije taksonomske grupe u okviru morskog fitoplanktona su silikatne alge (*Bacillariophyta*) i dinoflagelate (*Dinophyceae*), a u nešto manjoj meri zlatne (*Chrysophyceae*) i modrozelenne alge (*Cyanobacteria*).

Nekoliko autora ukazivalo je na to da čestice u moru značajno povećavaju kapacitet preživljavanja virusa i povećavaju njegov potencijal za interakcijama sa lokalnim morskim organizmima (**Shumway, 1990; Reynolds, 2006**). Virus se veoma lako apsorbira na fine, partikularne čestice, i na taj način se transportuju kroz vodu, pa sve do uzgajališta školjki, pa predstavljaju rizik po zdravlje ljudi. Neka istraživanja u Jadranskom moru, pokazala su da neke vrste algi adsorbiraju viruse i tako umanjuju mogućnost njihovog otkrivanja. Priliv nutritijenata u proleće i jesen predstavlja glavni razlog za povećanje koncentracije hlorofila *a* i brojnosti fitoplanktona (**Krivokapić i sar., 2009**).

U našem istraživanju brojnost fitoplanktona, odnosno koncentracija hlorofila *a* nije u korelaciji sa pojavom virusa, odnosno zaključili smo da ovi parametri nemaju uticaja na njegovu pojavu i da ne mogu biti indikatori pojave virusa u dagnjama. U zimskom delu godine, njegova bujnost opada, a beleži se veća pojava virusa.

S porastom temperature tokom letnjih meseci, uspostavlja se termoklima koja razdvaja trofičnu zonu od dubinske, bogate nutritijentima. U jesenjem delu godine,

opadanjem temperature vode, dolazi do ponovnog mešanja vodenih masa i nutritijenata i povećanja produkcije, čemu doprinose i vetrovi i smanjeni intenzitet svetlosti. Sve zelene biljke sadrže hlorofil, pa koncentracija fotosintetskih pigmenata može poslužiti kao indikator biomase fitoplanktona.

Dokaz norovirusa i u našim uzorcima, potkrepljuje činjenicu da je norovirus rasprostranjen svuda u svetu. Ovi rezultati mogu doprineti uvođenju kvalitetnog plana monitornoga dagnji. Implementacija monitoring programa omogućila bi bolje upravljanje uzgojem i plasiranjem dagnji na tržište. Razvojem novih dijagnostičkih metoda moguće je otkriti prisustvo virusa i u malim količinama koje mogu biti dovoljne za izazivanje bolesti

Sa druge strane, testiranje krajnjih proizvoda na prisustvo virusa, ne može upotpunosti osigurati bezbednu hranu na tržištu. Troškovi testiranja stavljaju se na teret subjekata u poslovanju hranom (SPH), odnosno proizvođača školjki, što može koštati proizvođače i 10% od ukupne vrednosti njihovog ulova, s obzirom na cenu kompleta reagensa koji se koriste za molekularna ispitivanja (*Hess, 2010*). Osim toga, testiranje krajnjih proizvoda ne uzima u obzir osnovni uzrok problema, što je čovekovo zagađenje fekalijama u području proizvodnje dagnji.

Proizvođači školjki su takođe odgovorni za procenu rizika u proizvodnim područjima i za dobru proizvodnu praksu koju primenjuju da bi umanjili uticaj izvora zagađenja (*DEFRA, 2015*). Kontrola NoV-a treba da smanji rizik pre žetve, pošto su najznačajniji izvori virusa u područjima sakupljanja školjke izvori ljudskog zagađenja fekalijom. Trenutno, vodoprivredna preduzeća u Evropi nisu regulisana za virusno zagađenje. Nije moguće preporučiti jedno rešenje za inaktivaciju NoV, a troškovi često prevazilaze finansijske mogućnosti vezane za inaktivaciju virusa (*Barret i sar., 2016*).

Osim dagnji, sveže povrće i maline su takođe visoko rizične namirnice sa aspekta norovirusne infekcije, kako zbog toga što se jedu uglavnom bez predhodne termičke obrade, tako i zbog nemogućnosti kvalitetnog ispiranja/pranja namirnice. Kontaminacija hrane virusima sve je veći javno zdravstveni problem i potrebna je kvalitetna saradnja i koordinacija svih institucija uključenih u proces nadzora i proizvodnje kvalitetnih i zdravstveno ispravnih namirnica na tržištu.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenog ispitivanja, dobijenih rezultata kao i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Primenom molekularne metode Real Time RT-PCR dokazano je prisustvo norovirusa u 41% ispitivanih uzoraka dagnji.

2. U pozitivno identifikovanim uzorcima, kod 4 (12,9%) je utvrđeno prisustvo norovirusa genogrupe GI, a kod 17 (54,8%) uzorka norovirus genogrupe GII, dok je kod 10 (32,3%) uzoraka utvrđeno istovremeno prisustvo norovirusa obe genogrupe (GI+GII).

3. Metodom genotipizacije utvrđeno je da su svi detektovani norovirusi genogrupe GI pripadali genotipu GI.2, dok je većina detektovanih norovirusa genogrupe GII pripadala genotipu GII.4, izuzev jednog koji je pripadao genotipu GII.2.

4. Rezultati filogenetske analize ukazuju na genetsku sličnost između norovirusa izolovanih u ovoj disertaciji i onih ranije opisanih u svetu. Na osnovu nukleotidne sekvence ispitanog ORF2 fragmenta sojeva NOV_GI_MNE 1, 2, 3, 4 utvrđena je sličnost od 98,1% do 99,2% sa izolatom Southampton virusa (L07418), a na nukleotidne sekvence ispitanog ORF2 fragmenta sojeva NOV_GII_MNE 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 22, 24 utvrđena je sličnost od 96,4% do 98,5% sa izolatom Hu/GII.4/sydney/NSW05 (JX459908), trenutno najrasprostranjenijem epidemijskim sojem.

5. Ustanovljena je sezonska varijacija prisustva norovirusa u dagnjama. Najveći broj pozitivnih uzoraka zabeležen je tokom zimskih meseci, odnosno u decembru, januaru i februaru, dok je najmanji broj pozitivnih uzoraka detektovan u letnjem periodu.

6. Statističkom analizom ustanovljeno je da se sa smanjenjem temperature mora statistički značajno povećava pojava virusa u ispitivanim uzorcima dagnji. Ostali ispitivani fizičko-hemijski parametri morske vode (pH, salinitet, zasićenje kiseonikom) nisu imali statistički značajan uticaj na pojavu norovirusa u dagnjama.

7. Varijacija bujnosti fitoplanktonske komponente i koncentracije hlorofila a nije imala statistički značajan uticaj na pojavu virusa u dagnjama.

8. Nije ustanovljena statistički značajna korelacija između mikrobioloških parametara morske vode i pojave virusa u dagnjama.

9. Nije ustanovljena korelacija između najverovatnijeg broja *E.coli* i pojave virusa u dagnjama. Norovirus je ustanovljen u 15 uzoraka koji su inače zadovoljavali propisane kriterijume higijene za najverovatniji broj *E.coli* u dagnjama.

10. Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju na potrebu uspostavljanja plana monitoringa prisustva norovirusa u dagnjama, u cilju poboljšanja javnog zdravlja.

8. SPISAK LITERATURE

1. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD (2014): *Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis*. The Lancet Infectious Diseases, 14: 725–730.
2. Alfano-Sobsey E, Sweat D, Hall A, Breedlove F, Rodriguez R, Greene S (2012): *Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission*. Epidemiology and Infection, 140 : 276–282.
3. American Public Health Association (APHA). 1995. Standard Methods for the Examination for Water and Wastewater (19th edition). Byrd Prepress Springfield, Washington.
4. Anderson TF, Stanley WM (1941): *A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum*. J. Biol. Chem. 139: 339-345.
5. Anon (2004a): Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for food of animal origin. O. J. Eur. Commun.L226, 22–82.
6. Anon (2004b), Corrigendum to Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. O. J. Eur. Commun. L226, 83–127.
7. Appleton H, Pereira MS (1977): Lancet, I, 780-781.
8. Atmar RL (2010): *Noroviruses – State of the Art*. Food Environ Virol. 2:117- 126.
9. Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, Estes MK (1995): *Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR*. Appl. Environ. Microbiol. 61:3014-3018.

10. Atmar RL, Estes MK (2001): *Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses*. Clin. Microbiol. Rev. 14:15–37.
11. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH., Graham DY (2008): *Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection*. Emerg. Infect Dis. 14:1553- 1557.
12. Barrett M, Fitzhenry K, O’Flaherty V, Doré W, Keaveney S, Cormican M (2016): *Detection, fate and inactivation of pathogenic norovirus employing settlement and UV treatment in wastewater treatment facilities*. Science of the Total Environment 568: 1026–1036.
13. Bazzardi R, Fattaccio MC, Salza S, Canu A, Marongiu E, Pisanu M (2014): *Preliminary study on Norovirus, hepatitis A virus, Escherichia coli and their potential seasonality in shellfish from different growing and harvesting areas in Sardinia region*. Italian Journal of Food Safety, 3:1601.
14. Bella G, Martella V, Basanisi MG (2016): *Food-Borne Viruses in Shellfish: Investigation on Norovirus and HAV Presence in Apulia (SE Italy)*. Food Environ Virol, 1–8.
15. Bellou M, Kokkinos PA, Vantarakis (2013): *Shellfish-Borne Viral Outbreaks: A Systematic Review*. Food Environ. Virol. 5: 13-23.
16. Berg DE, Kohn MA, Farley TA, McFarland LM (2000): *Multi-State Outbreaks of Acute Gastroenteritis Traced to Fecal-Contaminated Oysters Harvested in Louisiana*. J. Infect. Dis. 181: 381-386.
17. Bresee JS, Widdowson MA, Monroe SS, Glass RI (2002): *Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities*. Clin. Infect. Dis. 35: 748- 753.
18. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA (2005): *Norovirus recombination in ORF1/ ORF2 overlap*. Emerg. Infect. Dis. 11: 1079- 1085.
19. Bull RA, Tanaka MM, White PA (2007): *Norovirus recombination*. J. Gen. Virol. 88:3347-3359.

20. Burkhardt III W, Calci KR (2000): *Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness*. Appl. Environ. Microbiol. 66:1375-1378.
21. Campos JA, Lees DN (2014): *Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters*. Applied and Environmental Microbiology, 80:3552–3561.
22. Carlos JA, Simon RK, Ron JL (2013): *Environmental influences on faecal indicator organisms in coastal waters and their accumulation in bivalve shellfish estuaries and coasts*. Est Coast 36: 834–853.
23. Caul OW (1996): *Viral gastroenteritis; small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective*. J. Clin. Pathol. 49: 874- 880.
24. CEFAS (2014): *A critical review of the current evidence for the potential use of indicator species to classify UK shellfish production areas*. Final report, project FS512006.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2007): *Norovirus activity—United States, 2006–2007*. MMWR Recomm Rep. 56:842–846.
26. Centers For Disease Control And Prevention (CDC) (2011): *Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines*. MMWR Recomm Rep. 60, 1–20.
27. Cheng PK, Wong DK, Chung TW, Lim WW (2005): *Norovirus contamination found in oysters worldwide*. J. Med. Virol. 76: 593-597.
28. Classification and Nomenclature of Viruses (2005). Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press.
29. Comelli HL, Rimstad E, Larsen S, Myrmel M (2008): *Detection of norovirus genotype I.3b and II.4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods*. International Journal of Food Microbiology 127: 53–59.
30. Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM (2006): *Development, evaluation, and standardization of a realtime TaqMan reverse transcription-PCR assay for*

quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. Appl. Environ. Microbiol. 72:3846–3855.

31. Croci L, Losio MN, Suffredini E, Pavoni E, Di Pasquale S, Fallacara F (2007): *Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea.* International Journal of Food Microbiology 114: 252–257.

32. Croci L, Suffredini E (2003): *Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici.* Ann Ist Super Sanità 39:35-45.

33. D’Souza DH (2014): *Phytocompounds for the control of human enteric viruses.* Current opinion in virology 4:44–49.

34. Da silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS (2007): *Evaluation of removal of Noroviruses during wastewater treatment, using real- time reverse transcription- PCR: Different behaviors of genogroups I and II.* Appl. Environ. Microbiol. 73: 7891- 7897.

35. DEFRA (2015). *FSA Project FS246004/Defra Project WT1529—Enhancing knowledge of norovirus behaviour in the marine environment to enable better risk management in molluscan shellfisheries.* Department for Environment, Food and Rural Affairs, from http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=13029_WT1529Riskfactorsfornorovirusinoysters.pdf

36. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MPG, Estes MK (2004): *Laboratory efforts to cultivate noroviruses.* J Gen Virol 85: 79–87.

37. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2012): *Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options.* EFSA Journal 10: 2500.

38. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2015): *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014.* EFSA Journal 13(12), 19.

39. EURL (2014). *Annual Technical Report of Calendar Year 2013.* European Union Reference Laboratory for Monitoring Bacteriological and Viral Contamination of Bivalve Molluscs. Final report version 3. March

40. FAO (2014): *The state of world fisheries and aquaculture 2012*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and agriculture organization of the United Nations, Rome.
41. Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X (2005): *Seroprevalence of noroviruses in swine*. J Clin Microbiol 43: 657–661.
42. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. E., Ball L.A (2005): Virus Taxonomy. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
43. Flannery, Keaveney J, Sinéad D, William (2009): *Use of FRNA Bacteriophages To Indicate the Risk of Norovirus Contamination in Irish Oysters*. Journal of Food Protection 11:2236-2435.
44. Fong TT, Lipp EK (2005): *Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools*. Microbiol Mol Biol Rev 69:357–371.
45. Gao Z, Li X, Yan H (2015): *Human calicivirus occurrence among outpatients with diarrhea in Beijing, China, between April 2011 and March 2013*. Journal of Medical Virology 87:2040–2047.
46. Giammanco GM, De Grazia S, Tummolo F, Bonura F, Calderaro A, Buonavoglia A (2013): *Norovirus GI.4/Sydney/2012 in Italy, winter 2012–2013*. Emerging Infectious Diseases 19: 1348–1349.
47. Goodgame RW (2001): *Viral causes of diarrhea*. Gastroenterol. Clin. N. Am. 30:779- 795.
48. Green DH, Lewis GD (1999): *Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription PCR and cell culture*. Water Res. 33:1195-1200.
49. Green K (2013): *Caliciviridae: The noroviruses*. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6:583–609). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

50. Green KY (2007): *Caliciviridae: The noroviruses*. In: Knipe, Howley D.M., Griffin P. M., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B editors. *Fields Virology*. 5. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 949-979.
51. Gužvić M (2013): *The History of DNA Sequencing / Istorijat sekvenciranja DN*. *Journal of Medical Biochemistry* 32: 301–312.
52. Hardy ME (2005): *Norovirus protein structure and function*. *FEMS Microbiology letters* 253:1-8.
53. Hasle GR, Syvertsen EE (1996): *Marine diatoms*. In: *Identifying marine diatoms and dinoflagellates*. Thomas, C. R. (eds.), Academic Press, San Diego, 5-385.
54. Henigman U, Biasizzo M, Vadnjak S, Toplak A, Gombac M, Steyer A, Poljšak Prijatelj M, Ambrožič M, Fonda I, Kirbiš A, Barlic M (2015): *Molecular characterisation of noroviruses detected in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from harvesting areas in Slovenia*. *New Microbiologica* 38: 225-233.
55. Hernroth and Allard (2007): *The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*)*, *Int J Food Microbiol.* 113:296-302.
56. Hess P (2010): *Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 1683–1694.
57. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): *Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences*. *Bio-Technology* 10:413–417.
58. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus-factsheet.htm>
59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 15.08.2014.
60. <http://www.noronet.nl>
61. <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool> 20.08.2014.

62. Hudson JB, Sharma M, Vimalanathan S (2009): *Development of a practical method for using ozone gas as a virus decontaminating agent*. *Ozone Sci Eng* 31:216-23.
63. Hurst CJ, Blannon JC, Hardaway R, Jackson WC (1994): *Differential effect of tetrazolium dyes upon bacteriophage plaque assay titers*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3462–3465.
64. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK (2002): *Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type*. *J. Infect. Dis.* 185: 1335– 1337.
65. Hutson A, Atmar RL, Estes MK (2004): *Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors*. *Trends Microbiol.* 12:279– 287.
66. Hyde JL, Mackenzie JM (2012): *Pathogenesis and replication of norovirus: following the mouse tail?* *Microbiology Australia.* 1(1): 74-76.
67. ICTVdB. (2004): *Norovirus*. In *ICTVdB- The universal Virus Database*, ed. C. BuchenOsmond. New York; ICTVdB Management, Columbia University.
68. International Organization for Standardization. 2005. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli. Most probable number technique*. ISO Norm 7251:2005. ISO, Geneva, Switzerland
69. International Organization for Standardization. 2013. *Microbiology of food and animal feed—horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR—part 1: method for quantification*. ISO/TS 15216–1:2013. ISO, Geneva, Switzerland
70. Jeffrey SW, Mantoura RFC (1997) *Pigment abbreviations used by SCOR WG 78*. In. Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds) *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO. Paris, 564-565
71. Jiang S, Noble R, Chu W (2001): *Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California*. *Appl Environ Microbiol* 67: 179–184.

72. Jiang X, Graham DY, Wang KN, Estes MK (1990): *Norwalk virus genome cloning and characterization*. Science 250:1580-1583.
73. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK (1992): *Expression, selfassembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein*. J. Virol. 66:6527-6532.
74. Jones MK, Grau KR, Costantini V, Kolawole AO, Graaf M De (2015): *Human norovirus culture in B cells*. Nature Protocols 10:1939–1947.
75. Jori G, Camerin M, Soncin M, Guidolin L, Coppelotti O (2011): *Antimicrobial photodynamic therapy: basic principles*. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: Medical and environmental applications 3–14.
76. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K (2003): *Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR*. J. Clin. Microbiol. 41:1548–1557.
77. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N., Katayama K (2004): *Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan*. J. Clin. Microbiol. 42:2988– 2995.
78. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Tornhill TS, Kalica AR, Chanock RM (1972): *Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis*. J. Virol. 10: 1075-1081.
79. Kingsley DH, Hoover DG, Papafragkou E, Richards GP (2002): *Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure*. J. Food Prot. 65:1605–1609.
80. Kingsley DH, Chen H (2009): *Influence of pH, salt, and temperature on pressure inactivation of hepatitis A virus*. Int J Food Microbiol. 130:61- 4.
81. Kirkland KB, Meriwether RA, Leiss JK, WR Mackenzie (1996): *Steaming oysters does not prevent Norwalk-like gastroenteritis*. Public Health Rep. 111: 527-530.

82. Kocwa-Haluch R (2001): *Waterborne enteroviruses as a hazard for human health*. Polish J. Environ. Studies 10:485-487.
83. Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL (2010): *Noroviruses: The Principal Cause of Foodborne Disease Worldwide*. Discov. Med. 10:61-70.
84. Koopmans M, E Duizer (2004): *Foodborne viruses: an emerging problem*. J. Food Microbiol. 90:23-41.
85. Krivokapić S, Vuksanović N, Stanković Ž (2009): *Seasonal variation of phytoplankton biomass and environmental conditions in the inner Boka Kotorska Bay (eastern Adriatic Sea)*. Acta Bot. Croat. 68 :45–55.
86. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G (2013): *Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping*. Archives of Virology 158:2059–2068.
87. Krstulović M, Šolić, Marasović (1992): *Relationship between bacteria, phytoplankton and heterotrophic nanoflagellates along the trophic gradient*. Helgoländer Meeresuntersuchungen 51: 433–443.
88. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN (1993): *Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus*, Science.
89. Lamhoujeb S, Fliss I, Ngazoa SE, Jean J (2009): *Molecular study of the persistence of infectious human norovirus on food-contact surfaces*. Food Environ. Virol. 1: 51-56.
90. Le Guyader FS (2008): *Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak*. J. Clin. Microbiol. 46:4011- 4017.
91. Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J (2012): *Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play*. Curr. Opin. Virol. 2:103-110.
92. Le Guyader FS, Neill FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E (2003): *A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak*. International Journal of Food Microbiology 87: 107–112.

93. Le Guyader FS, Pommepeuy M, Atmar RL (2009): *Monitoring viral contamination in shellfish-growing areas*. In: Burnell, G.; Allan, G., editors. *New technologies in aquaculture*. New York: CRC Press. 542-579.
94. Lee JE, Lee H, Cho YH, Hur HG, Ko G (2011): *F+RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea*. *Science and the Total Environment* 412–413, 127–131.
95. Lee N, Chan MC, Wong B, Chor KW, Sin W, Choi KW (2007): *Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis*. *Emerg Infect Dis* 13:1399-401.
96. Lee R, Kay D, Wyer M, Murray L, Stapleton C (2010): *Sanitary profiling of shellfish harvesting areas*. *Safe management of shellfish and harvest waters*. IWA Publishing, London, United Kingdom p 121–143.
97. Lees DN (2000): *Viruses and bivalve shellfish*. *Int. J. Food Microbiol.* 59:81-116.
98. Lees D, Younger A, Dore B (2010): *Depuration and relaying*. In: Rees G, Pond K, Kay D, Bartram J, Santo Domingo JS (Eds.), *Safe management of shellfish and harvest waters*. World Health Organization (WHO), IWA Publishing, London, UK, pp. 145–181
99. Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric R (2008): *Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations*. *PLoS Medicine* 5: 269-290.
100. Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, Debbink K (2012): *Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation*. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002705.
101. Lipp EK, Jarrell JL, Griffin DW, Lukasik J, Jacukiewicz J, Rose JB (2002): *Preliminary evidence for human fecal contamination in corals of the Florida Keys, USA*. *Mar. Poll. Bull.* 44:666-670.
102. Lipp M, Bluth A, Eyquem F, Kruse L, Schimmel H, Van den Eede G, Anklam E (2001): *Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of*

genetically modified organisms in various processed foodstuffs. Eur. Food Res. Technol. 212:497-504.

103. Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS (2005): *Realtime RT-PCR for norovirus screening in shellfish*. J. Virol. Methods 123:1-7.

104. Lopman B, Armstrong B, Atchison C, Gray JJ (2009): *Host, weather and virological factors drive norovirus epidemiology: Time-series analysis of laboratory surveillance data in England and Wales*. PLoS One 4(8):e6671.

105. Lopman B, Gastan P, Woo Park G, Hall AJ, Parashar UD, Vinje J (2012): *Environmental transmission of norovirus gastroenteritis*. Curr. Opin. Virol. 2:96–102.

106. Lopman BA, Kadak G, Reacher M, Brown DWG (2003): *Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992–2000*. Emerg. Infect. Dis. 9: 71–77.

107. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW (2004): *Clinical manifestations of norovirus gastroenteritis in health care settings*. Clin. Infect. Dis. 39:318–324.

108. Lowther JA, Avant JM, Gizynski K, Rangdale RE, Lees DN (2010): *Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers*. J. Food Prot. 73:305-311.

109. Lowther JA, Gustar NE, Hartnell RE, Lees DN (2012): *Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels*. Journal of Food Protection, 75:389–393.

110. Lu J, Sun L, Fang L (2015): *Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015*. Emerging Infectious Diseases, 21: 1240–1242.

111. Luksiene Z, Brovko L (2013): *Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety*. Food Engineering Reviews 5: 185–199.

112. Maalouf H, Schaeffer S, Parnaudeau J, Le Pendu RL, Atmar SE, Crawford FS, Le Guyader (2011): *Strain-Dependent Norovirus Bioaccumulation in Oysters*. Appl. Environ. Microbiol. 77:3189- 3196.
113. Mariam TW, Cliver DO (2000): *Hepatitis A virus control in strawberry products*. Dairy Food Environ. Sanit. 20:612-616.
114. Martin J, Wehmiller F, Scott Harris M, David Liddell W (1996): *Comparative Taphonomy of Bivalves and Foraminifera from Holocene Tidal Flat Sediments, Bahia la Choya, Sonora, Mexico (Northern Gulf of California): Taphonomic Grades and Temporal Resolution*. Paleobiology, 22: 80-90.
115. Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS, Rocks JJ, Kiel J, Montes JS, Moe CL, Eisenberg JNS, Leon JS (2012): *The epidemiology of published norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup*. Epidemiol. Infect. 140: 1161–1172.
116. McDonnell S, Kirkland KB, Hlady WG, Aristeguieta C, Hopkins RS, Monroe SS, Glass RI (1997): *Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis*. Arch. Intern. Med. 157:111-116.
117. Medici MC, Tummolo F, Calderaro A, Chironna M, Giammanco GM, De Grazia S (2015): *Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015*. Euro Surveill. 20(35):30010.
118. Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MSJ, Vinje J (2010): *Novel norovirus in dogs with diarrhea*. Emerg Infect Dis 16:980–982.
119. Mesquita JR, Costantini VP, Cannon JL, Lin SC, Nascimento MSJ, Vinje J (2013): *Presence of antibodies against genogroup VI norovirus in humans*. Virol J 10:17.
120. Morillo SG, Timenetsky M (2011): *"Norovirus: an overview"*. Revista Da Associação Médica Brasileira 57 (4): 453–8.
121. Nappier SP, Graczyk TK, Schwab KJ (2008): *Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by Crassostrea virginica and Crassostrea ariakensis oysters*. Appl. Environ. Microbiol. 74: 6825–6831.

122. NSSP (2013). *NSSP Guide for the Control of Molluscan Shellfish: 2013 Revision*. from <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FederalStateFoodPrograms/ucm2006754.htm>
123. Papafragkou E, Hewitt J, Park GW, Greening G, Vinje J (2013): *Challenges of culturing human norovirus in threedimensional organoid intestinal cell culture models*. PLoS ONE 8:e63485.
124. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR (1977): *Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent*. N. Engl. J. Med. 297: 86-89.
125. Patel MHA, Vinje J, Parashar U (2009): *Noroviruses: a comprehensive review*. J. Clin. Virol. 44: 1–8.
126. Pavoni E, Consoli M, Suffredini E, Arcangeli G, Serracca L, Battistini R (2013): *Noroviruses in seafood: a 9-year monitoring in Italy*. Foodborne Pathogens and Disease, 10:533–539.
127. Polo D, Vilarino ML, Manso CF, Romalde JL (2010): *Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses*. *Emerging Infectious Diseases*, 16:1036–1038.
128. Polo D, Varela MF, Romalde JL (2015): *Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas*. Int J Food Microbiol. 193:43-50.
129. Pommepuy M, Dumas F, Caprais MP, Camus P, Mennec Le (2004): *Sewage impact on shellfish microbial contamination*. Water Science Technology 50:117–124.
130. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK (1999): *X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid*. Science 286:287-290.
131. Prato R, Lopalco PL, Chirona M, Barbuti G, Germinario C, Quarto M (2004): *Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy*. BMC Infect. Dis. 4:1471-2334.

132. Prieur D, Mével G, Nicolas JL, Plusquellec A, Vigneulle M (1990): *Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 28: 277–352.
133. Ramani S, Atmar RL, Estes MK (2014): *Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. Curr Opin Gastroenterol* 30:25-33.
134. Reynolds (2006): *The ecology of phytoplankton*. Cambridge
135. Richards GP, McLeod C, Le Guyader FS (2010): *Processing strategies to inactivate enteric viruses in shellfish: limitations of surrogate viruses and molecular methods. Food Environ Virol* 2:183-193.
136. Richards GP, Watson MA, Meade GK, Hovan GL, Kingsley DH (2012): *Resilience of Norovirus GII.4 to freezing and thawing; Implication for virus infectivity. Food Environ. Virol.* 4: 192- 197.
137. Rizzo C, Di Bartolo I, Santantonio M, Coscia MF, Monno R, De Vito D, Ruggeri FM, Rizzo G (2007): *Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. BMC Infect. Dis.* 7:1471- 2334.
138. Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Calgua B, Carratala A, Maluquer de Motes C, Rusinol M, Moresco V, Ramos AP, Martinez-Marca F, Calvo M, Monte Barardi CR, Girones R, Bofill-Mas S (2014): *Adenovirus and Norovirus contaminants in commercially distributed shellfish. Food Environ. Virol.,* 6: 31–41.
139. Rzezutka A, Cook N (2004): *Survival of human enteric viruses in the environment and food., FEMS Microbiology Reviews.* 28(4):441–453.
140. Sair AI, D’Souza DH, Jaykus LA (2002): *Human Enteric Viruses as Causes of Foodborne Disease. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 1:73-89.
141. Schaper M, Duran A, Jofre J (2004): *Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. Applied and Environmental Microbiology* 68:3702–3707.

142. Schwab KJ, Neill FH, Estes MK, Metcalf TG, Atmar RL (1998): *Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR*. J. Food Prot. 61:1674–1680.
143. Scipioni A, Mauroy A, Ziant D, Saegerman C, Thiry E (2008): *A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition*. J. Virol. 5:1-8.
144. Seah EL, Gunsekere IC, Marshall JA, Wright PJ (1999): *Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses*. Arch. Virol. 144:1007–1014.
145. Seiderer LJ, Newell RC (1985): *Relative significance of phytoplankton bacteria and plant detritus as carbon and nitrogen resources for the kelp bed filter-feeder Chromytilus meridionalis*. Marine Ecology Progress Series 22: 127-139.
146. Shin BS, Oh EG, Yu HS, Son KT, Lee HJ, Park JY, Kim JH (2013): *Genetic Diversity of Noroviruses Detected in Oysters in Jinhae Bay*. Korea Food Sci Biotechnol 22:1453-1460.
147. Shumway SE (1990): *A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture*. J. World Aquac. Soc. 21:65-104.
148. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL (2009): *Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007*. Journal of Infectious Diseases 200(5):802–812.
149. Siokou-Frangou I, Pagou K (2000): *Assessment of the trophic conditions and ecological status in the Inner Saronikos Gulf*. Technical Report for the Ministry of Environment, Planning and Public Works, NCMR, Athens, 43.
150. Škoro I (2015): *Detection and phylogenetic analysis of norovirus from bivalve molluscs at production areas in the Republic of Croatia*. PhD thesis.
151. Sl.list CG, br.2/07 od 29.oktobra 2007: *Uredbe o klasifikaciji i kategorizaciji površinskih i podzemnih voda*.

152. Stals A, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M (2012): *Extraction of food-borne viruses from food samples: a review*. Int. J. Food Microbiol. 153:1-9.
153. Subasinghe R, Doris S, Jiansan J (2009): Global aquaculture and its role in sustainable development. Aquaculture 1: 2-9.
154. Suffredini E, Lanni L, Arcangeli G, Pepe T, Mazzette R, Ciccaglioni G, (2014): *Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy*. International Journal of Food Microbiology 184: 21–26.
155. Suffredini E, Magnabosco C, Civettini M, Rossetti E, Arcangeli G, Croci L (2012): *Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas*. Journal of Applied Microbiology 113(3): 686–692.
156. Suffredini E, Pepe T, Ventrone I, Croci L (2011): *Norovirus detection in shellfish using two Real-Time RT-PCR methods*. New Microbiologica, 34(1): 9–16.
157. Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S (1998): *Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs*. Arch. Virol. 143:1215–1221.
158. Svraka S, Duizer E, Vennema H, De Bruin E, Van Der Veer B, Dorresteijn B, Koopmans M (2007): *Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005*. J. Clin. Microbiol. 45:1389–1394.
159. Takanashi S, Saif LJ, Hughes JH, Meulia T, Jung K, Scheuer KA, Wang Q (2013): *Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures*. Arch Virol.
160. Tam CC, Rodrigues L, O'Brien SJ (2003): *The study of infectious intestinal disease in England: what risk factors for presentation to general practice tell us about potential for selection bias in case-control studies of reported cases of diarrhoea*. Int. J. Epidemiol. 32: 99–105.
161. Terio V, Di Pinto A, Bottaro M, Shehu F, Catella C, Martella V (2014): *Occurrence of norovirus and hepatitis A virus in shellfish*. Albanian Journal of Agricultural Sciences, 13: 461–465.

162. Thorne LG, Goodfellow IG (2014): *Norovirus gene expression and replication*. J. Gen. Virol. 95: 278–291.
163. Uhrbrand K, Myrmel M, Maunula L, Vainio K, Trebbien R (2010): *Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels*. Journal of Virological Methods 169:70–78.
164. Utermöhl (1958): *Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodic*. Mitt.Int. Verein. Limnol. 9: 1-38.
165. Van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, White PA, Koopmans M (2013): *Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012*. Eurosurveillance 18: 1-2.
166. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J (2014): *Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009–2013*. Journal of Clinical Microbiology 52(1): 147–155.
167. Vinjé J (2015): *Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus*. Journal of Clinical Microbiology 53(2):373–381.
168. Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD (2004): *Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II Noroviruses*. J. Virol. Methods 116:109–117.
169. Vuksanović N (2003): *Procjena količine fitoplanktona u području Crnogorskog primorja kao posljedica eutrofikacije*. Zaštita voda, Zbornik radova, 383-385.
170. Wetz JJ, Lipp EK, Griffin DW, Lukasik J, Wait D, Sobsey MD, Scott TM, Rose J.B (2004): *Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys*. Mar. Poll. Bull. 48:698-704.
171. Whitehead B, Owen P, Henshaw L, Beddingham E (2016): *Supporting newly qualified nurse transition: A case study in a UK hospital*. Nurse education today. 36: 58–63.

172. Winndowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, Salehi EDP, Swanson E, Totaro J, Woron R, Mead PS, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI (2005): *Norovirus and foodborne diseases, United States, 1991- 2000*. Emerg. Infect. Dis. 11: 95- 102.

173. Winterbourn JB, Clements K, Lowther JA, Malham SK, McDonald JE (2016): *Use of Mytilus edulis biosentinels to investigate spatial patterns of norovirus and faecal indicator organism contamination around coastal sewage discharges*. Water Research, 105:241–250.

174. Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D’Agostino M, Divizia M, Fleischer J (2011): *Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters*. Water Research, 45(3):1025–1038.

175. Yee EL, Palacio H, Atmar RL, Shah U, Kilborn C, Faul M, Gavagan TE, Feigin RD, Versalovic J, Neill FH, Panlilio AL, Miller M, Spahr J, Glass RI (2007): *Widespread outbreak of norovirus gastroenteritis among evacuees of Hurricane Katrina residing in a large “megashelter” in Houston, Texas: Lessons learned for prevention*. Clin. Infect. Dis. 44: 1032–1039.

176. Zahorsky J (1929): *Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease*. Arch. Pediatr. 46:391–395.

BIOGRAFIJA

Nevena N. Ilić rođena je 01.04.1989. godine u Kosovskoj Mitrovici. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Školske 2008/2009 upisala je prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Oktobra 2013. godine, diplomirala je sa prosečnom ocenom 9,35. Školske 2013/2014 upisala je doktorske akademske studije na istom fakultetu. Položila je sve ispite u prediviđenom roku sa prosečnom ocenom 9,73.

Od 01. oktobra 2014. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, za užu naučnu oblast Higijena i tehnologija mesa i od tada je uključena u izvođenje praktične nastave iz predmeta Higijena i tehnologija mesa, Kontrola namirnica animalnog porekla i Osnove higijene namirnica animalnog porekla.

Učesnica je na projektu evidencionog broja TR31034 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: "Odabrane biološke opasnosti za bezbednost/kvalitet hrane animalnog porekla i kontrolne mere od farme do potrošača",

Do sada ima objavljenih 18 radova od toga 2 sa SCI liste.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Nevena N. Ilić

Broj upisa: 15/7

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

“Identifikacija i filogenetska analiza norovirusa poreklom iz dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) sa aspekta bezbednosti hrane”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 13.09.2017.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Nevena N. Ilić

Broj upisa: 15/7

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: “**Identifikacija i filogenetska analiza norovirusa poreklom iz dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) sa aspekta bezbednosti hrane**”

Mentor 1: prof. dr Mirjana Dimitrijević

Mentor 2: dr Branko Velebit

Potpisana: Nevena N. Ilić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 13.09.2017.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Identifikacija i filogenetska analiza norovirusa poreklom iz dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) sa aspekta bezbednosti hrane”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 13.09.2017.
