

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ivana M. Živković

**EKSTRAKT KORE NARA (*PUNICA
GRANATUM* L.) KAO PRIRODNI ANTIVIRUSNI
AGENS ZA REDUKCIJU
HUMANIH NOROVIRUSA *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Ivana M. Živković

**POMEGRANATE PEEL EXTRACT (*PUNICA
GRANATUM* L.) AS A NATURAL ANTIVIRAL
AGENT FOR REDUCTION OF HUMAN
NOROVIRUS *IN VITRO***

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

Mentor:

dr Dragoslava Radin, redovni profesor
Katedra za tehnološku mikrobiologiju, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

dr Ivana Stanković, redovni profesor
Katedra za fitopatologiju, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Dubravka Bigović, viši naučni saradnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd

dr Zorica Radulović, redovni profesor,
Katedra za tehnološku mikrobiologiju, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Milena Pantić, vanredni profesor,
Katedra za tehnološku mikrobiologiju, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

ZAHVALNICA

Ova disertacija je rezultat višegodišnjeg rada i zato želim da iskoristim priliku da se iskreno zahvalim izuzetnim ljudima koji su bili sa mnom na ovom putu.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki redovnom profesoru dr Dragoslavi Radin na sveobuhvatnom angažovanju, izuzetnoj podršci, savetima i stručnoj pomoći tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se naučnom savetniku dr Katarini Šavikin na neprocenjivoj i stručnoj pomoći, korisnim sugestijama u toku izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se višem naučnom saradniku dr Dubravki Bigović na neprocenjivoj pomoći i savetima tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se redovnom profesoru dr Zorici Radulović na svestranoj stručnoj pomoći, korisnim sugestijama i prijateljskim savetima koje mi je dala u toku izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem vanrednom profesoru dr Mileni Pantić na svim stručnim i prijateljskim savetima koje mi je dala, a koji su mi u mnogome pomogli od početka mojih studija.

Najtoplije se zahvaljujem dr Ivanu Radinu na neprocenjivoj pomoći, savetima i podršci.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama sa katedre za Tehnološku mikrobiologiju koji su mi svako na sebi svojstven način pomogli u izradi ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem docentu dr Lazaru Kaluđeroviću na neizmernoj podršci i iskrenom prijateljstvu u toku doktorskih studija.

Najtoplije se zahvaljujem Institutu za povrtarstvo, Smederevska Palanka, na podršci koju su mi ukazali. Posebnu zahvalnost dugujem naučnom saradniku dr Jeleni Damnjanović i kolegi Aleksandru Markoviću, na pomoći i svim prijateljskim savetima.

Najveću i neizmernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, sestrama, Milivoju Jovoviću i njihovim porodicama, koji su verovali u mene, pružili mi bezuslovnu ljubav, podršku, savete, koji su me učili da ne odustajem i čije bodrenje je bilo dragoceno.

EKSTRAKT KORE NARA (PUNICA GRANATUM L.) KAO PRIRODNI ANTIVIRUSNI AGENS ZA REDUKCIJU HUMANIH NOROVIRUSA *IN VITRO*

SAŽETAK

Humani norovirusi (HuNoV) su dominantni uzročnici epidemija akutnog gastroenteritisa izazvanih kontaminiranom hranom. U cilju njihove redukcije sa površine svežeg povrća i površina koje dolaze u kontakt sa hranom, testirana je antinorovirusna aktivnost 11 ekstrakata lekovitih biljaka. Za dalja istraživanja izabran je ekstrakt kore nara, koji je u koncentraciji 5 mg/mL redukovao broj čestica HuNoV za 99% u fosfatnom puferu, simuliranim gastrointestinalnim fluidima i na površinama svežeg čeri paradajza i mladog luka, a za 91% u mleku. Matični sok od nara redukovao je HuNoV za 97%. Potencijal ekstrakta kore nara kao prirodnog dezinfekcionog sredstva na površinama od nerđajućeg čelika i plastike je značajan ($> 3 \log_{10}$ GE/ μ L) i u skladu sa predloženim normama koje se primenjuju za virusna dezinfekciona sredstva. Radi komparacije, testirano dezinfekciono sredstvo na bazi hipohlorita (250 ppm) redukovalo je HuNoV na približno istom nivou. Proverena je dezinfekcija površina kontaminiranih mešavinom suspenzija HuNoV i koliformne bakterije *Escherichia coli*, primenom brzog ATP bioluminiscentnog testa i RT-qPCR metodom. Sredstvo na bazi hipohlorita bez naknadnog ispiranja, dalo je rezultat koji se našao u zoni upozorenja, dok su rezultati nakon ispiranja vodom detektovani u zoni čistog. Broj detektovanog HuNoV na nerđajućem čeliku i plastici, posle sanitacije sa sredstvom na bazi hipohlorita iznosio je 2,2 odnosno 2,38 \log_{10} GE/ μ L. Takođe, pokušano je da se primenom alergen indikator protein testa detektuju različite koncentracije HuNoV (10^3 - 10^6 GE/ μ L) nanete na prethodno sterilisanu površinu nerđajućeg čelika. Posle inkubacije na 70°C/10 min, što povećava senzitivnost testa, najviša testirana koncentracija virusa dala je pozitivan rezultat.

Ključne reči: humani norovirusi, medicinski biljni ekstrakti, ekstrakt kore nara, antinorovirusni efekat, komercijalni dezinficijensi

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK broj: 634.64+632.953]:578.835.1(043.3)

POMEGRANATE PEEL EXTRACT (*PUNICA GRANATUM* L.) AS A NATURAL ANTIVIRAL AGENT FOR THE REDUCTION OF HUMAN NOROVIRUS *IN VITRO*

ABSTRACT

Human noroviruses (HuNoV) are the dominant agents of foodborne acute gastroenteritis and epidemic outbreaks. In order to reduce them from the surface of fresh vegetables and food-contact surfaces, the antinoroviral activity of 11 medicinal plant extracts was tested. For further research, pomegranate peel extract was selected, which at a concentration of 5 mg/mL reduced the number of HuNoV particles by 99% in phosphate buffer, simulated gastrointestinal fluids and on the surface of fresh cherry tomatoes and green onions, and by 91% in milk. Pomegranate juice reduced HuNoV by 97%. The potential of pomegranate peel extract as a natural disinfectant on stainless steel and plastic surfaces is significant ($> 3 \log_{10}$ GE/ μ L) and in accordance with the proposed standards applicable to viral disinfectants. For comparison, the tested hypochlorite-based disinfectant (250 ppm) reduced HuNoV to approximately the same level. Disinfection of surfaces contaminated with a mixture of suspension of HuNoV and coliform bacteria *Escherichia coli* was checked, using a rapid ATP bioluminescence test and RT-qPCR method. The hypochlorite-based agent without subsequent rinsing gave the result that was in the warning zone, while the results after rinsing with water were detected in the clean zone. The number of detected noroviruses on stainless steel and plastic, after sanitation with a hypochlorite-based agent was 2,2 and 2,38 \log_{10} GE/ μ L, respectively. Also, an attempt was made to detect different concentrations of HuNoV (10^3 - 10^6 GE/ μ L) applied to a previously sterilized stainless steel surface using an allergen indicator protein test. After incubation at 70°C/10 min which increases the sensitivity of the test, the highest tested virus concentration gave a positive result.

Key words: human noroviruses, medicinal plant extracts, pomegranate peel extract, antinoroviral effect, commercial disinfectants

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Industrial microbiology

UDK broj: 634.64+632.953]:578.835.1(043.3)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1. Karakteristike humanog norovirusa	4
2.1.1. Otkriće norovirusa.....	4
2.1.2. Morfologija i organizacija genoma Norovirusa.....	5
2.1.3. Ekspresija gena i replikacija humanog Norovirusa.....	6
2.1.4. Klasifikacija, taksonomija i raznovrsnost Norovirusa	7
2.1.5. Rezistentnost i perzistentnost humanih norovirusa.....	10
2.1.6. Putevi prenosa.....	14
2.1.7. Epidemiološki podaci i klinička slika norovirusne infekcije.....	15
2.2. Nar (<i>Punica granatum L.</i>).....	17
2.2.1. Potencijal ploda nara (<i>Punica granatum L.</i>).....	17
2.2.2. Proizvodi od nara kao prirodni aditivi i funkcionalna hrana	20
2.2.3. Hemijski sastav nara.....	21
2.2.4. Antimikrobni potencijal kore nara i njenog ekstrakta.....	23
2.2.5. Ispitivanje fizioloških aktivnosti ekstrakata kore ploda nara i moguća primena u prevenciji i lečenju bolesti.....	24
2.3. Antimikrobni potencijal ekstrakta lekovitih biljaka	25
2.4. Dezinfekcija i sanitacija površina koje dolaze u kontakt sa hranom	26
3. NAUČNI CILJ ISTRAŽIVANJA.....	28
4. MATERIJAL I METOD	29
4.1. Priprema suspenzije humanog norovirusa.....	29
4.1.1. Identifikacija i kvantifikacija virusnih čestica	29
4.2. Biljni materijal	30
4.2.1. Priprema i hemijska karakterizacija ekstrakata odabranih lekovitih biljaka	30
4.2.2. Priprema i hemijska karakterizacija ekstrakta kore i matičnog soka ploda nara	31
4.2.2.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola	31
4.2.2.2. Određivanje ukupnog sadržaja tanina	31
4.2.2.3. Određivanje bioaktivnih komponenti ekstrakta kore (PPE) i matičnog soka ploda nara (PJ).....	31
4.3. Metode ispitivanja antivirusnog efekta ekstrakta ploda nara i poređenje sa komercijalnim dezinfekcionim sredstvima.....	31
4.3.1. Tretman norovirusa lekovitim biljnim ekstraktima (LBE) u <i>in vitro</i> uslovima.....	31
4.3.2. Tretman humanih norovirusa (HuNoV) sa ekstraktom kore nara (PPE) u <i>in vitro</i> uslovima	32
4.3.2.1. Testiranje različitih koncentracija PPE	32
4.3.2.2. Ekstrakcija norovirusne RNK.....	32

4.3.3. Perzistentnost HuNoV u simuliranim gastrointestinalnim uslovima i modelu hrane	33
4.3.3.1. Rastvori i model hrane za testiranje perzistentnosti humanog norovirusa	33
4.3.3.2. Ispitivanje perzistentnosti HuNoV	33
4.3.3.3. Testiranje antivirusne aktivnosti PPE.....	33
4.3.3.4. Ekstrakcija norovirusne RNK	34
4.3.4. Redukcija HuNoV ekstraktom kore nara na svežem povrću.....	35
4.3.5. Testiranje antinorovirusnog potencijala ekstrakta kore nara na površinama	36
4.3.6. Testiranje komercijalnih dezinfekcionih sredstava za redukciju HuNoV	37
4.3.6.1. Komercijalna dezinfekciona sredstva.....	37
4.3.6.2. Brisevi za testiranje potencijala dezinfekcionih sredstava	37
4.3.6.3. Površine za testiranje antivirusnog potencijala	38
4.3.6.4. Priprema suspenzije bakterije <i>Escherichia coli</i>	38
4.3.6.5. Tretman mešanih bakterijskih i virusnih kontaminenata na površinama	38
4.3.6.6. LIGHTNING ATP metoda	39
4.3.6.7. RT-qPCR metoda	39
4.4. Detekcija kapsida norovirusa na površinama	40
4.5. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze kojoj predhodi reverzna transkripcija (RT-qPCR).....	41
4.5.1. Reagensi i kitovi za izolaciju RNK i RT-qPCR test	41
4.6. Transmisiona elektronska mikroskopija.....	44
4.7. Statistička analiza.....	45
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA	46
5.1. Kvantifikacija humanih norovirusa u suspenziji	46
5.2. Antivirusni potencijal ekstrakta lekovitih biljaka	46
5.3. Hemijska analiza ekstrakta kore (PPE) i matičnog soka ploda nara (PJ)	49
5.4. Antivirusni potencijal ekstrakta kore nara u <i>in vitro</i> uslovima	50
5.4.1. Redukcija humanog norovirusa ekstraktom kore nara	50
5.4.2. Redukcija humanih norovirusa u modelu hrane i simuliranim gastrointestinalnim fluidima	52
5.4.3. Redukcija humanog norovirusa na površini svežeg povrća	57
5.4.4. Analiza čestica norovirusa transmisionom elektronskom mikroskopijom.....	59
5.5. Redukcija humanih norovirusa u suspenziji i na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom	60
5.5.1. Redukcija humanih norovirusa ekstraktom kore nara i komercijalnim dezinfekcionim sredstvima na površinama	60
5.5.2. Provera efikasnosti sanitacije površina komercijalnim dezinfekcionim sredstvima.....	62
5.5.2.1. Detekcija HuNoV na površinama RT-qPCR metodom.....	62
5.5.2.2. Detekcija adenozin trifosfata (ATP).....	64
5.6. Efikasnost dezinfekcionih sredstava na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom.....	66

5.7. Detekcija virusnog kapsida primenom FLASH® Alergen Indikator Protein testa	68
5.8. Detekcija humanih norovirusa primenom različitih komercijalnih kitova.....	69
6. ZAKLJUČAK.....	71
7. LITERATURA	74
BIOGRAFIJA AUTORA	102
Изјава о ауторству.....	103
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	104
Изјава о коришћењу.....	105

1. UVOD

Virusi su obligatni intracelularni patogeni čija replikacija zavisi od ćelija domaćina. Virusni su od davnina izazivali epidemije i visoku stopu morbiditeta, pogotovo uzimajući u obzir njihovu veliku sposobnost mutacije (Svensson et al., 2016). Bez obzira što, za razliku od bakterija, nisu u stanju da se razmnožavaju u hrani ili životnoj sredini virusi koji se prenose hranom su ozbiljan problem za javno zdravlje i jedan od glavnih uzroka bolesti dece, starijih i imunokompromitovanih osoba. Prema izveštajima stručnjaka koji se bave procenom rizika i identifikovanjem prioriteta bezbednosti hrane korišćenjem *Delfi* tehnike, virusi koji se prenose hranom predstavljaju prioritet prehrambene industrije (Rowe et al., 2016). Virusni su najčešće povezani sa prenosom putem hrane su: humani norovirusi (HuNoV), hepatitis A (HAV), zatim hepatitis E (HEV), rotavirusi, astrovirusi, sapovirusi i drugi enterovirusi. Na osnovu simptoma koji se javljaju nakon infekcije, grupisani su u viruse koji izazivaju gastroenteritis, zatim hepatitis i treću grupu čine virusi koji se umnožavaju u digestivnom traktu ljudi, a izazivaju oboljenje kada migriraju u druge organe. Virusni gastrointestinalni sindrom ili virusni gastroenterokolitis se često naziva „stomačni grip” ili nebakterijski enterokolitis (Atmar et al., 2006).

Virusi koji se prenose hranom generalno su ekološki stabilni, mogu preživeti nepovoljne uslove i otporni su na ekstremne pH vrednosti i uslove gastrointestinalnog trakta. Smatra se da imaju niske infektivne doze, što u kombinaciji sa činjenicom da ne menjaju sastav hrane niti senzorne karakteristike, predstavlja značajan problem kontaminacije hrane (Greening et al., 2016). Kao poseban problem izdvaja se opšte prisutna globalizacija u prometu hrane, koja utiče na kvalitet i bezbednost pogotovo svežih proizvoda (najčešće voća i povrća). Iako se pretpostavlja da je sveža hrana higijenski ispravna to nije uvek slučaj, ukoliko se uvozi iz zemalja u kojima kriterijumi opšte higijene ne ispunjavaju međunarodne standarde (Cliver et al., 2009; Food and Drug Administration, FDA, 2012). To je jedan od razloga da je Svetska Zdravstvena Organizacija 2015. godine svoju kampanju posvetila važnosti bezbedne hrane širom planete. I kampanja „Bezbedna hrana od farme do tanjira“, imala je za cilj da ukaže da kontaminacija hrane može da se dogodi na svim nivoima u lancu hrane, od primarne proizvodnje, prerade i transporta, do pripreme i konzumiranja hrane (Centers for Disease Control, CDC, 2015; Li et al., 2015).

Prema izveštajima CDC najčešći virusni agensi koji izazivaju gastroenteritis u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) su HuNoV sa 19-21 milion slučajeva dijareje i povraćanja godišnje, dok oko 465 hiljada ljudi zatraži lekarsku pomoć. Takođe, prema podacima istog izvora procenjuje se da svake godine HuNoV izazove 58% bolesti koje se prenose hranom (Bartsch et al., 2020). Slični podaci se beleže i u zemljama Evropske Unije, kada je HuNoV bio povezan sa najvećim brojem alimentarnih epidemija nebakterijskog gastroenteritisa (European Food Safety Authority, EFSA 2016). U izveštaju o detektovanim alimentarnim epidemijama za 2018 godinu, EFSA navodi da su HuNoV i HAV zajedno sa bakterijom *Salmonella*, vodeći u epidemijama koje su povezane sa hranom i vodom (EFSA, 2019). Posebnu težinu ovom pitanju daje pretpostavka da je broj inficiranih osoba mnogo veći od registrovanih (van Beek et al., 2018), zbog čega je bezbednost hrane i vode koja se odnosi na viruse u mnogim zemljama jedan od najvažnijih aspekata (Pires et al., 2013).

U Srbiji usled nedovoljno razvijenih i neujednačenih laboratorijskih analiza, epidemiološka situacija kada su u pitanju virusi koji se prenose hranom još uvek je 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 virusa u uzorcima fecesa. Tokom petogodišnjeg istraživanja (2012-2016) norovirusne infekcije su se javljale svake godine u svim starosnim kategorijama. Norovirus je dokazan kao značajno najčešći uzročnik epidemija dijarejalnog sindroma u Vojvodini, i dominantan uzročnik infekcije kod odraslih starijih od 20 godina (Patić, 2018). U ovom naučno istraživačkom radu obuhvaćene su 1003 osobe sa gastrointestinalnom infekcijom, od kojih je kod 703 pacijenata potvrđena virusna gastrointestinalna infekcija (70,69%).

Čestim epidemijama doprinosi genetička raznovrsnost HuNoV (Hardstaff et al., 2018). I pored činjenice da je širom sveta dominantna genogrupa GII.4, jasno se uočava pojava novih sojeva GII.4 norovirusa svake 2-3 godine, koji se javljaju kao rezultat tačkastih mutacija i genetskih rekombinacija (Lopman et al., 2016). Takođe, jedan od faktora koji značajno doprinosi kako čestim epidemijama tako i sporadičnim slučajevima izazvanim HuNoV jeste nedostatak vakcine (Riddle et al., 2016; Melhem et al., 2019), kao i činjenica da se ovi virusi veoma lako prenose fekalno-oralnim putem kontaminiranom hranom i vodom, od osobe do osobe, putem kontakta sa kontaminiranim površinama, i kroz aerosole. Posebno otežavajuće pitanje je odsustvo brze i rutinske detekcije (Hall et al., 2014; Pires et al., 2015) i dijagnostike (Bull and White, 2011). Dijagnoza infekcije izazvane mikrobiološki kontaminiranom hranom se vrši na osnovu kliničke slike koja se retko potvrđuje laboratorijskim testovima. Danas je u upotrebi RT-qPCR koji predstavlja „zlatni standard“ u detekciji i identifikaciji virusa u različitim vrstama uzoraka (Sidoti et al., 2015; Platts-Mills et al., 2013). Sa razvojem molekularnih metoda broj identifikovanih i potvrđenih sporadičnih slučajeva se znatno povećao u mnogim zemljama (Ahmed et al., 2014).

Hrana koja se najviše povezuje sa virusnom kontaminacijom uključuje sveže i zamrznuto voće (maline i drugo jagodasto voće) i povrće (zelena salata, mladi luk), školjke (sirove ostrige), voćne sokove, delikatesno meso (EFSA/ECDC, 2016). Evropski sistem za brzo obaveštavanje o bezbednosti hrane i hrane za životinje (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) ukazuje da su norovirusi relativno „nov pojam“ u istoriji citiranja RASFF-a u odbijanju proizvoda sa granica prilikom izvoza (uključujući i treće zemlje), ali „staro poznanstvo“ postoji u notifikacijama upozorenja da je neki proizvod kontaminiran njima. Relativna učestalost citiranja i obaveštenja tipa upozorenja na noroviruse, svrstava ih daleko ispred dobro poznatih patogene hrane bakterijskih rodova *Salmonella* i *Listeria*, i označava ih kao ozbiljnu biološku opasnost (Papapanagiotou et al., 2017). Norovirusi mogu predstavljati ozbiljan problem za Srbiju koja je vodeća zemlja po količini izvoza smrznute maline, kupine i višnje. Nakon izbijanja nekoliko epidemija povezanih sa zamrznutim malinama poreklom iz Srbije 2013. godine, Evropska komisija za zdravlje i bezbednost hrane (DG Sanco 2013-6660 - Mr final, European Commission, Health and Food Safety, 2013) je uvela rigoroznu mikrobiološku kontrolu koja se odnosila na kontaminente maline prilikom uvoza u EU iz Republike Srbije. U tom momentu se smatralo da je osnovni razlog povlačenja proizvoda kontaminacija norovirusima usled nedostatka higijenskih mera (EFSA, 2014). Mera dodatne desetoprocentne kontrole, odnosno kontrole svake desete pošiljke malina iz Srbije na norovirus dovela je do dodatnih troškova za izvoznike i umanjenja prihoda proizvođača malina. Na osnovu kasnije ostvarenih dobrih rezultata dodatne mere kontrola su ukinute. Prema podacima EUROSTAT-a Srbija je 2018. godine bila zemlja sa najvećim izvozom (oko 80 046 tona) zamrznutih malina u EU (European Commission, Health and Food Safety, 2019). Unakrsna kontaminacija sveže hrane, površina i ljudi dešava se lako jer je glavni izvor norovirusa fekalni materijal čoveka koji može sadržati i do 10^{11} virusnih partikula po gramu, koji se izlučuje iz organizma osoba sa izraženim simptomima (Karst, 2010). U lancu proizvodnje hrane, najefikasnija sredstva u borbi protiv norovirusne kontaminacije su jedinjenja na bazi hlora, ali u većoj koncentraciji nego što je potrebno da se unište bakterijske ćelije. Sa druge strane, sredstva na bazi hlora i njegovih jedinjenja mogu predstavljati ozbiljnu zdravstvenu opasnost ukoliko se koriste za dezinfekciju svežeg voća i povrća, proizvoda koji su povezani sa najvećim brojem epidemija. U nekim Evropskim zemljama upotreba hipohlorita i drugih jedinjenja na bazi hlora je zabranjena zbog mogućih stvaranja toksičnih nus-jedinjenja kao što su hloroform, hloramin i drugi (El-Senousy et al., 2014). Različita ispitivanja perzistencije i rezistencije vršena su u cilju pronalaska i primene alternativnog sredstva za inaktivaciju norovirusa. Utvrđeno je da kapsid virusa obezbeđuje značajan protektivni efekat jer je stabilan pri niskoj i neutralnoj pH vrednosti, kao i na temperaturu do 55°C (Pogan et al., 2018). Delovanje proteolitičkih enzima koji se prirodno nalaze u ljudskom organizmu, гастриčni (pepsin, pH 2) i intestinalni (tripsin i himotripsin, pH 8) ne izazivaju degradaciju kapsida virusa, do koje dolazi tek povećanom koncentracijom tripsina (Chassaing et al., 2020).

Značajnu pažnju je privukla primena prirodnih jedinjenja ili njihovih komponenti koje su bezbedne za upotrebu, a poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost u cilju sprečavanja kontaminacije hrane, inaktivacije virusa i lečenju infekcije (Li et al., 2013). Biljni ekstrakti su bogati različitim jedinjenjima (polifenoli i dr.) koja ispoljavaju antimikrobna svojstva što ih čini značajnim za primenu u tradicionalnoj medicini, za očuvanje sveže i prerađene hrane, u farmaceutskim proizvodima, alternativnoj medicini i prirodnim terapijama, kao potencijalni izvor novih lekova (Lucera et al., 2012; D'Souza et al., 2014). Takođe, i kada se razmišlja o alternativnim metodama za dekontaminaciju proizvoda, dezinfekciju površina koje dolaze u kontakt sa hranom, pored potencijalnih bioloških metoda kao što su aplikacija bakteriocina, bakteriofaga ili enzima, velika pažnja se usmerava ka fitohemijskim jedinjenjima.

U narodnoj medicini nar (*Punica granatum* L.) se koristio za jačanje imuniteta, protiv dijareje i drugih tegoba. Takođe, nar je u mnogim narodima simbol zdravlja i plodnosti. Nar je bogat visokom koncentracijom polifenola koji pozitivno utiču na zdravlje ljudi. Danas se ne koristi samo plod nara ili matični sok već i drugi njegovi delovi. Kora nara kao bioproizvod često je nazivan i biološkim otpadom industrije za proizvodnju soka. Sve veći broj istraživanja se odnosi na prednosti kore nara i jedinjenja koja su izolovana iz nje. Ekstrakt kore nara je interesantan kao bezbedan i prirodan potencijalni izvor antivirusnih jedinjenja u tretmanu norovirusne infekcije. Antivirusni potencijal ekstrakta kore nara je testiran i na površinama svežeg povrća kao i na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom.

2. PREGLED LITERATURE

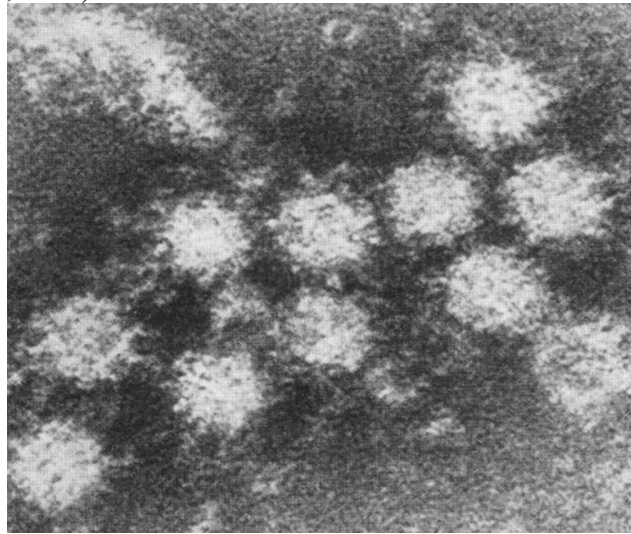
Pregled literature obuhvata dosadašnja saznanja o klasifikaciji, taksonomiji, građi norovirusnog genoma, perzistentnosti, rezistentnosti, učestalosti epidemija, kliničkoj slici, patogenezi i metodi detekciji. Osim humanog norovirusa, obuhvaćen je antimikrobni potencijal biljnih ekstrakta, karakteristike nara, hemijski sastav ploda i kore, zdravstveni benifiti, funkcionalna primena i antimikrobna efikasnost. Takođe, prikazana su različita dezinfekciona sredstva i vršena je komparacija sa ekstraktom kore nara.

2.1. Karakteristike humanog norovirusa

2.1.1. Otkriće norovirusa

Gastroenteritis izazvan norovirusima opisao je prvi put pedijatar dr Zahorsky J. 1929 godine. Norovirusna infekcija opisana je kao sporadični slučajevi dijareje i povraćanja kod novorođenčadi, koji su se obično javljali u hladnijim mesecima. U obimnoj studiji Zahorsky je opisao bolest kao „*Hyperemesis hiemis*” ili „zimski bolest povraćanja”, uz poseban značaj dobre higijenske prakse u sprečavanju širenja bolesti.

U epidemiji gastroenteritisa (1968) u osnovnoj školi Norwalk, Ohajo (SAD) obolelo je 50% učenika i nastavnika. Ova epidemija prema broju obolelih svrstana je u ozbiljnije zbog čega je CDC preduzeo nadležnost i uzorci fecesa su sačuvani. Epidemije su do tada označavane i dokumentovane kao akutni nebakterijski gastroenteritis. Bolest nazivana „Norwalk virus” ili „virus male okrugle strukture” utvrđena je od strane Kapikian et al. (1972) koji su pripremili filtrate uzorka fecesa iz epidemije 1968. godine. Pripremljeni filtrati su ispitani oralnim konzumiranjem dobrovoljca. Nekoliko ispitanika je razvilo simptome identične sa onim iz vremena epidemije u Norwalk-u. Uzorci fecesa dobrovoljaca analizirani su metodom imuno elektronske mikroskopije (IEM). U posmatranim uzorcima uočila se interakcija i obrazovanje kompleksa antigen-antitelo, odnosno čestice su agregirale i obložile se specifičnim antitelima (Anderson i Stanley, 1941; Kapikian i sar., 1972) (Slika 1). Dobijena slika omogućila je uočavanje čestica virusa (27 nm), koji do tada nisu imali jasno definisanu morfologiju i bili su među najmanje poznatim virusima. Metod koji se koristio za snimanje virusa nije bio nov, već je opisan 1941. godine u studiji sa virusom mozaika duvana (Markham et al., 1964).

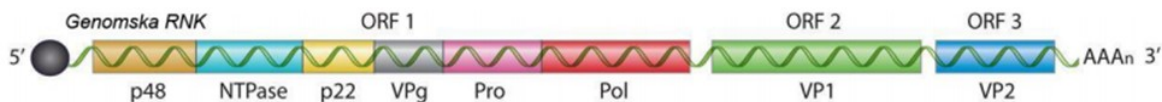


Slika 1. Metodom imunoelektronske mikroskopije identifikovane su 27 nm partikule povezane sa akutim nebakterijskim gastroenteritisom. Infekcija se razvila nakon što su ispitanici konzumirali filtrirani feces iz originalne Norwalk epidemije (u odnosu na 1:10). Prikazane virusne čestice su u velikoj meri obložene antitelima. Uveličanje 231,500x. (Kapikian et al., 1972.)

Pojava norovirusne infekcije različitih sojeva je bila učestala, pa su imena dodeljena na osnovu lokacije pojave novog soja: Montgomeri, Havaji, Snežna planina, Meksiko, Taunton i Toronto. U literaturi se može naći i pod drugim imenima: Norwalk virus, Norwalk-like virus (NLVs), mali virus zaobljene strukture (SRSVs), Snow Mountain virus, akutni nebakterijski gastroenteritis, virusni gastroenteritis i stomačni grip (Fauquet et al., 2005). Appleton je prvi put 1977. godine uveo ime Norovirus. Zvanično ime Norovirus usvojeno je 2002. godine od strane Međunarodnog komiteta za za taksonomiju virusa (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV; Estes et al., 2006).

2.1.2. Morfologija i organizacija genoma Norovirusa

Humani norovirus je mali izometrijski virusni agens (27-40 nm), bez ovojnice, obavijen proteinskim omotačem - kapsidom. Pod elektronskim mikroskopom norovirus liči na čašicu sa 32 udubljenja na površini, na osnovu čega je dobio ime *calyx* što na latinskom znači čaša. Genom se sastoji od linearno pozitivno orijentisane jednolančne RNK (ssRNA +). Veličina genoma je 7.6 kilobaza (kb) organizovan u tri otvorena okvira čitanja (Open Reading Frame, ORF) (Jiang et al., 1993). Genom je kovalentno vezan za virusni protein (*protein genome-linked*, VPg) na 5' genomsom kraju, dok je 3' kraj poliadenilovan (poli A rep). Uloga ORF-1 za sve noroviruse je u kodiranju poliproteina koji se u procesu translacije i nakon njenog završetka pod dejstvom proteaze (NS6) prevode u šest zrelih nestrukturanih proteina uključujući i NS6. Ostali nestrukturani proteini koji nastaju su: p48 (NS1/2), p41 (nukleozid trifosfataza - NS3), p22 (NS4), VPg (NS5) i RNK-zavisna RNK polimeraza (RdRp, RNA - dependent RNA polymerase; NS7). ORF-2 i ORF-3 kodiraju glavne strukturne proteine. Uloga ORF-2 i ORF-3 je u kodiranju proteina kapsida. Obrazuju se prilikom virusne replikacije, odnosno prevode se iz subgenomske RNK. ORF-2 ima ulogu u kodiranju glavnog proteina kapsida (VP1), a ORF-3 kodira mali sporedni protein kapsida (VP2). Subgenomska RNK je identična poslednjih 2.4 kb sa genomom i povezana kovalentno sa VPg na 5' kraju, a na 3' kraju poliadenilovan (Slika 2) (Robilottia et al., 2015; Thorne et al., 2014).

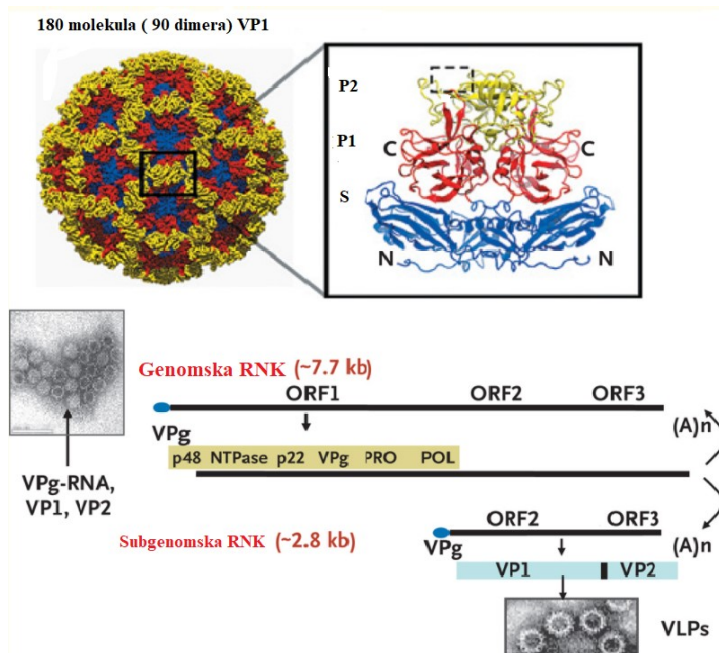


Slik

a 2. Organizacija genoma (Robilottia et al., 2015).

VP1 je glavni strukturni protein kapsida HuNoV. Devedeset dimera VP1 proteina prosečne molekulske mase 58 kilo Daltona (kDa) iznose približno 550 aminokiselina. Protein VP1 stvara šupljine koji daju izgled površini strukture sličnom čašama, odakle i naziv *calici* od latinske reči „*calyx*” ili „*cup*” čaša. Odgovor imunog sistema na norovirusnu infekciju povezan je sa VP1, zbog čega se dosadašnja istraživanja razvoja vakcine baziraju na ovom proteinu (Hardy, 2005; Kim et al., 2018). Protein VP1 može da se ponaša kao samostalna virusna čestica, ali ne sadrži RNK što znači da nije infektivna. U literaturi se često naziva i čestica slična virusu (virus-like particles, VLPs). Strukturnom analizom uviđeno je da se VP1 presavija u dva domena označena kao S (*shell*), domen ljuske koji učestvuje u formiranju ikozaedarne strukture i P (*protruding*), istureni domen koji formira izbočine na površini ljuske. N-centralni kraj čini domen S i sastoji se od 225 rezidua proteina i sve neophodne elemente za formiranje ikozaedarne strukture. Domen S je povezan sa formiranjem glatkog sloja kapsida. VLPs čestice imaju prečnik koji odgovara nativnoj strukturi norovirusa, ali nemaju ekspresiju P domena (Cao et al., 2007; Richardson et al., 2013). Domen S je univerzalan za sve noroviruse, koristi se za određivanje genogrupa i genotipova (Cao et al., 2007; Hardy, 2005). Takođe, domen S poseduje sve neophodne komponente da formira kapsid norovirusa samostalno. Domen P se proteže od domena S, formirajući izbočine koje se izdižu na površini kapsida. Domen P reguliše stabilnost i veličinu HuNoV kapsida, jer uspostavlja intermolekulske veze između podjedinica dimera VP1, ali nema formu VLPs (Tan et al., 2004). Dimeri P su stabilni

u širokom opsegu pH vrednosti, čime obezbeđuje perzistentnost i rezistentnost u spoljašnjoj sredini. Sadrže elemente koji omogućavaju specifično vezivanje za receptore (Strong et al., 2012). Domen P može da se vezuje za antigene histo-krvne grupe (histo-blood group antigens, HBGAs), koristeći isti obrazac kao nativni virusni kapsid, igrajući važnu ulogu u interakciji receptor virus-ćelija. Prisustvo antitela može da blokira interakciju VLPs sa HBGA, koji je u korelaciji zaštite bolesti što je ispitano kod dobrovoljaca koji su inficirani sa norovirusima (Lindesmith et al., 2003; Tan et al., 2004). Kroz različita istraživanja utvrđena su najmanje dva aspekta: domen P je raspoređen po celoj površini kapsida pri čemu je izuzetno fleksibilan, osetljiv i podložan mutacijama kako bi se lako vezivao za receptore ćelija. Kristalografijom je utvrđeno da se P domen sastoji se od dva subdomena P1 i P2, između kojih postoje interakcije (Prasad, 1999; Bu et al., 2008; Taube et al., 2010). Subdomen P2 se proteže od S domena ka spoljašnjoj strani kapsida i nalazi se u srednjem delu proteina VP1. Ovaj subdomen je hipervarijabilan i ima ulogu u vezivanju za receptore ćelije, imunološkoj reaktivnosti odnosno neutralizaciji antitela (Tan et al., 2008a). Sekvenciranjem VP1 proteina humanog norovirusa GII.4 potvrđena je raznolikost P2. Rezultati su ukazali da postoje dva mesta na P2 regionu na kojima dolazi do zamene redosleda aminokiselina i da su oni odgovorni za stvaranje čestih genetičkih varijanti GII.4 (Tan et al., 2011; Hardy, 2005). Navedena mesta se nalaze na površini virusnog kapsida zbog čega su izložena stalnom uticaju spoljašnje sredine. Ciljani protein za antitela je VP1 sa domenima S i P, pri čemu je subdomen P2 najviše izložen interakciji sa HBGA i neutralizatorima virusa. Dosadašnji mehanizmi koji objašnjavaju varijabilnost HuNoV zasnivaju se na subdomenu P2 jer se na njega vrši stalan pritisak zbog vezivanja za receptore domaćina i homologe rekombinacije u preklapajućem regionu ORF-1/ORF-2, generišući genotip (Tan et al., 2008). Interakcija P2 sa antigenima tkivno/krvnog sistema ABO određuje intezitet simptoma norovirusne infekcije. VP2 je manji strukturni protein, molekulske mase 29 kDa koji se nalazi u unutrašnjosti virusnog kapsida. Analizom genomske regije HuNoV određena je evolucionarna brzina kodiranja proteina VP2 značajno veća od proteina VP1. Odsustvo VP2 utiče na stabilnost i homogenost VLPs (Glass et al., 2009).

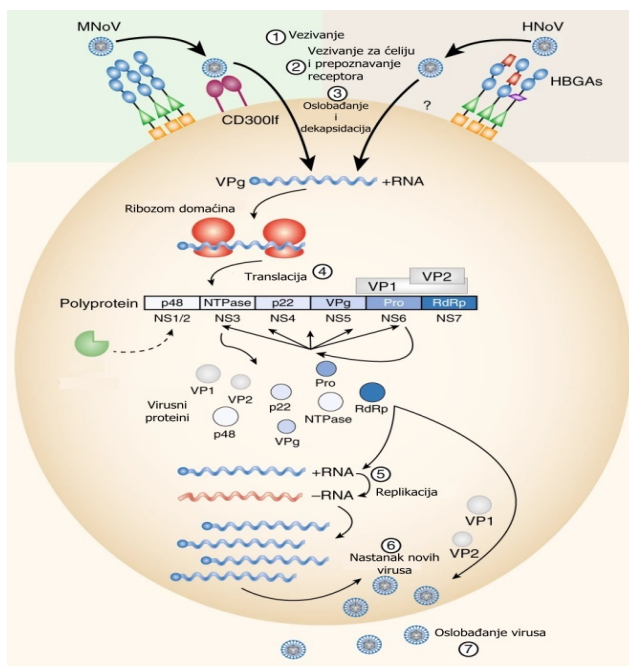


Slika 3. Prikaz organizacije glavnog strukturnog proteina (VP1), kapsida virusne partikule i genoma (Glass et al., 2009)

2.1.3. Ekspresija gena i replikacija humanog Norovirusa

Odsustvom tradicionalnih metoda gajenja u kulturi ćelija HuNoV prikaz replikacije je izvršen na osnovu njegovog surogata murine norovirusa (MNV). Surogat MNV se efikasno replikuje u ćeliji,

dok RNK HuNoV još uvek nije u potpunosti istražena. Takođe, smatra se da HuNoV i MNV dele više od 60 % sličnosti aminokiselina (Leen et al., 2012; Atmar, 2010). Replikacioni ciklus norovirusa (Slika 4) započinje vezivanjem i ulaskom u ćeliju. Vezivanje i ulazak HuNoV omogućen je preko antigena histo-krvne grupe (HBGAs). Nakon ulaska u ćeliju vrši se dekapidacija i oslobađanje RNK u citoplazmu. Pozitivni lanac jednolančane virusne RNK se ponaša kao iRNK. Protein VPg na 5' kraju virusnog genoma dolazi u interakciju sa inicijalnim faktorima translacije domaćina što dovodi do translacije i aktivacije ribozoma. Translacija virusnih proteina VP1 i VP2, primarno počinje od subgenomske RNK. Analizama je utvrđeno da je prisutan u znatno višoj koncentraciji u odnosu virusnu RNK što se smatra strategijom virusa (Thorne et al., 2014; de Graaf et al., 2016; Hassan and Baldrige, 2019). Deo genoma ORF-1 kodira sintezu poliproteina i tokom translacije do njenog završetka, formirani poliprotein se cepa dejstvom pod proteaze (NS6) na šest zrelih nestrukturnih proteina (p48, p41, p22, VPg, proteazu i RNK zavisnu RNK polimerazu). Translacija proteina VP2 - reinicijalnim mehanizmom započinje terminacijom jer je norovirusna RNK policistronska (Naphthine et al., 2009). Ribozomi nakon završetka translacije ORF (VP1) ostaju vezani za RNK do početka translacije ORF (VP2). Replikacija se odvija preko negativnog lanaca RNK koji služi kao intermedijer za sintezu nove genomske i subgenomske RNK dejstvom virusne RNK zavisne RNK polimeraze. Nakon prevođenja roditeljskog virusnog genoma, iRNK dalje služi kao šema (*template*) za formiranje dvolančane replikativne forme. Proces pokretanja sinteze negativne RNK na dolaznoj roditeljskoj RNK nije potpuno razumljiv. Subgenomska RNK sadrži ORF-2 i ORF-3 i služi za obrazovanje kapsidnih proteina VP1 i VP2, koji dalje učestvuju u translaciji (unutar replikacionog kompleksa) ili se pakuju u kapsid (VP1), stvarajući nove virione. Stvoreni virioni napuštaju ćeliju, a sam mehanizam izlaska iz ćelije nije sasvim objašnjen (Thorne et al., 2014; de Graaf et al., 2016; Hassan and Baldrige, 2019). Uspešnost gajenja postignuta je odnedavno u novom sistemu kulture koji se sastoji od matičnih ćelija enteroida izolovanih iz crevnih kripti intestinalnog ljudskog tkiva (Ettayebi et al., 2016; Alvarado et al., 2018).



Slika 4. Replikacija mišijeg (MNV) i humanog norovirusa (HuNoV) (Hassan i Baldrige, 2019).

2.1.4. Klasifikacija, taksonomija i raznovrsnost Norovirusa

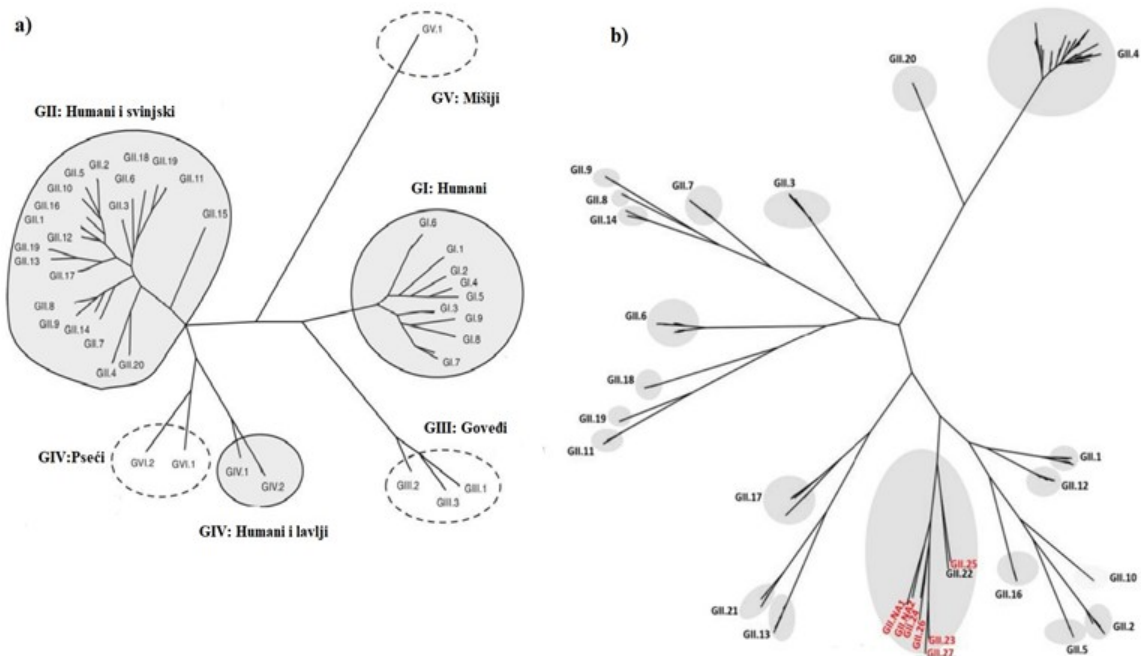
Razvojem molekularnih dijagnostičkih metoda početkom 90-ih godina, pojavile su se i prve studije koje su na osnovu nukleotidne sekvence opisale strukturu norovirusa. Danas su sekvence

norovirusnog genoma dostupne za više od 100 sojeva. Genom Norovirusa pripada porodici *Caliciviridae* koji je dalje genetički podeljen u grupe prema domaćinu kog inficiraju. Porodica *Caliciviridae* obuhvata jedanaest rodova, od kojih sedam članova inficiraju sisare (*Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* i *Vesivirus*), dva inficiraju ptice (*Bavovirus* i *Nacovirus*) i dva roda inficiraju ribe (*Minovirus* i *Salovirus*). Klinički najvažniji predstavnici familije *Caliciviridae* su humani norovirusi. Pored roda *Norovirus* i virusi iz roda *Sapovirus* (*Saporo-like virus*), mogu da izazovu slična oboljenja kod ljudi, ali znatno ređe (Chhabra et al., 2019). Norovirusi se neprestano menjaju i generišu nove sojeve svake 2-4 godine, što uslovljava pojavu epidemija u svetu (Boon et al., 2011; Chan et al., 2015).

Razvojem metoda omogućena je filogenetska klasifikacija genogrupa i genotipova koja se zasniva na sekvenciranju amino kiselina VP1 proteina. Razlika u sekvencama do 20% je korišćena kao granični prag za nove genotipove, a kasnije je pomerena na 15%. Aminokiselinska sekvenca VP1 proteina se koristi za određivanje genogrupe i genotipa HuNoV na sledeći način: razlike u sekvencama do 14.3% klasifikuju ih u istu genogrupu, razlike između 14,3 – 43,8% klasifikuju ih u isti genotip; razlike između 45-61% klasifikuju ih u istu genogrupu (Slika 5a). Zbog nedostatka standarda klasifikacije za norovirus nekoliko istraživačkih grupa koristile su kratku sekvencu, označenu kao region C za klasifikaciju genotipova što je dovelo do nedosledne klasifikacije nekih sojeva norovirusa (Iturriza-Gomara et al., 2008; Huhti et al., 2011; Kroneman et al., 2013). Značajnoj raznovrsnosti HuNoV doprinosi, pored klasifikovanih sojeva, nekoliko novih neklasifikovanih koji su identifikovani kod slepih miševa, morskih lavova i lučkih pliskavica (morske svinje ili mali kitovi). Genogrupa II genotip 4 (GII.4) je najrasprostranjenija sa najvećom stopom varijabilnosti.

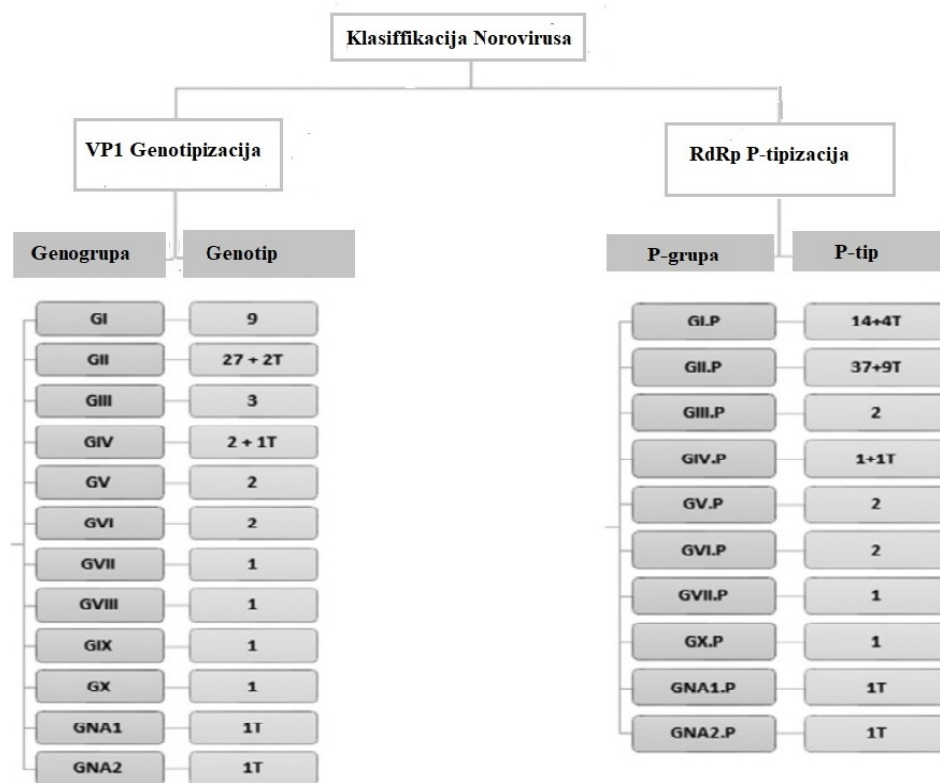
Univerzalnu efikasnu klasifikaciju za norovirus, predstavila je 2013. godine Radna grupa za klasifikaciju norovirusa (Norovirus Classification Working Group, NCWG). Predložena je univerzalna standardna nomenklatura i sistem za određivanje genotipova GI i GII korišćenjem filogenetskog grupisanja kompletnih aminokiselinskih sekvenci VP1 (Kroneman et al., 2013; Chhabra et al., 2020). Na osnovu dostupnih podataka sekvenci norovirusi su klasifikovani u šest genogrupa (GI-GVI), sa predloženom sedmom (GVII) (Kageyama et al., 2004; Vinjé, 2014), dok genogrupe obuhvataju više od 40 genotipova (Chhabra et al., 2020). Norovirusi koji inficiraju ljude su svrstani u genogrupe GI, GII, GIV, dok su genotipovi GII.11, GII.18 i GII.19 specifični za svinje a genotip GIV.2 je detektovan samo kod mačaka i pasa (Zheng et al., 2006; Ford-Siltz et al., 2019; Chhabra et al., 2020). Postavljeni kriterijumi nomenklature nisu mogli da se ispune za genetičku podgrupu GII.4. Kako bi se izvršila ispravna podtipizacija odlučeno je da se filogenesko grupisanje novih varijanti GII.4 prepozna nakon izbijanja najmanje dve epidemije na različitim geografskim lokacijama. Osam GII.4 varijanti bile su dominantne poslednjih dve decenije, zamenjujući prethodnu, a od 2012 GII.4 Sydney, New Orleans, Hong Kong su povezane sa najvećim brojem epidemija (Bull and White, 2011; Debbink et al., 2011; Ford-Siltz et al., 2019).

Prema ažuriranoj klasifikaciji iz 2019. godine norovirusi su svrstani u deset genogrupa (GI-GX) i 48 genotipova zasnovano na celoj sekvenci aminokiselina proteina VP1 i deo RdRp. Neki genotipovi su reklasifikovani, na primer GII.15 je postala nova genogrupa GIX (Kitajima et al., 2016; Tohma et al., 2018; Chhabra et al., 2020). Dominantnost u izbijanju epidemija povezanih sa GII.4 se može pripisati konstantom evolucijom VP1, a rezultat je pojavljivanje antigenetskih varijanti svake 2-8 godine. Filogenetsko stablo zasnovano na sekvencama kapsida proteina VP1 norovirusa (Slika 5b) prikazuje sve klasterne genotipova do sada poznatih, jedan novi GI klaster (GI.9) i tri nova GII klastera GII.20-GII.22 (Desselberger, 2019). Sekvence sojeva za koje nije mogao da se odredi genotip i za koje su bile dostupne najmanje dve neidentične kompletne sekvence VP1 sa različitim geografskih lokacija kandidovane su za novu genogrupu ili genotip. Genogrupa ili genotip za koji je bila dostupna samo jedna kompletna sekvenca VP1 ili samo sekvence sa jedne geografske lokacije označene su kao nedodeljene (NA) (Chhabra et al., 2020).



Slika 5. Univerzalna filogenetska klasifikacija norovirusa (a) i klasifikacija GII (b) koja je zasnovana na VP1 aminokiselinskim sekvencama obuhvata dva neraspoređena genotipa. Nove identifikovane genogrupe označene su crvenom bojom (Vinjć, 2014; Chhabra et al., 2020).

Klasifikacija na osnovu RNK-zavisne RNK polimeraza (RdRp) sekvence na nivou genotipa označene su kao P-grupa, a na nivou genotipa kao P-tip. Oznaka P je uvedena kako bi se genogrupe i genotipovi razlikovali od podele genogrupe na osnovu VP1 proteina. Kada je dostupna samo jedna RdRp sekvenca, dobija se oznaka NA sa brojevima (na primer GI.PNA1, GII.PNA2). Ranija klasifikacija norovirusa zasnivala se samo na VP1 proteinu, a kada nije poznata njegova sekvenca označavani su slovima abecede (Slika 6). Budući da je sve veći broj rekombinatnih sojeva bio prepoznat, predložena je nova klasifikacija (Mans et al., 2015; Cannon et al., 2019; Degiuseppe et al., 2017; Matsushima et al., 2016). Poslednje decenije detektovano je nekoliko novih norovirusnih sekvenci identifikovanih kod novih domaćina sa različitim geografskih lokacija. Chhabra i sar., (2020) su potvrdili klasifikaciju genogrupe VII koja je izolovana iz fecesa dece obolele od akutnog gastroenteritisa (2004) u Japanu, fekalnih briseva kod pasa, u Hong Kongu, Kina (2007) i iz kanalizacione vode u Urugvaju (2012). Ovi uzorci su potvrdili klasifikaciju nove genogrupe GVII (Bull et al., 2011; Debbink et al., 2011b; Kroneman et al., 2013; Chhabra et al., 2020; CDC, 2019).



Slika 6. Ažurirana šema klasifikacije norovirusa sa brojem genogrupa i genotipova na osnovu kompletnih sekvenci aminokiselina proteina VP1; brojem P-grupa i P-tipova na osnovu dela regiona (762 nukleotida) RNK zavisne RNK polimeraze (RdRp) na 5'-kraju ORF-1. P-P grupa, T-okvirni genotip/P-tip (kada je dostupan samo jedan niz ili više neidentičnih sekvenci sa jedne geografske lokacije), NA-nisu dodeljeni (Chhabra et al., 2020).

2.1.5. Rezistentnost i perzistentnost humanih norovirusa

Infekcije izazvane HuNoV zbog njihove niske infektivne doze, visoke koncentracije izlučivanja prilikom ispoljavanja simptoma, perzistentnosti i rezistentnosti u spoljašnjoj sredini je teško sprečiti i kontrolisati. Većina dosadašnjih istraživanja navedenih karakteristika i dostupnih podataka o HuNoV dobijeno je korišćenjem njihovih surogata, pre svega zbog odsustva tradicionalnih metoda gajenja u kulturi tkiva ili na životinjama. Mačiji kalicivirus (FCV) je najčešće korišćen za studije a odabran je zbog genetičke sličnosti sa HuNoV. Mišiji norovirus (MNV) je prvi norovirus koji je gajen u kulturi tkiva, sličnih genetičkih i strukturnih karakteristika sa HuNoV. Nedavno izolovani kalicivirus iz fecesa majmuna (*Macaca mulatta*) je Tulune virus (TV), predstavlja novi rod *Recovirus* koji ne pripada rodu *Norovirus*, ali je genetički vrlo sličan HuNoV (Hirneisen and Kniel, 2013).

Jedan od važnih faktora koji doprinosi čestim epidemijama širom sveta je sposobnost HuNoV da ostanu infektivni duži vremenski period pod različitim uslovima u spoljašnjoj sredini (Bosch et al., 2018, Rajiuddin et al., 2020). Sa aspekta bezbednosti hrane, održivost i očuvanje infektivnosti virusa tokom dužeg vremenskog perioda na temperaturama frižidera i zamrzivača je veoma nepovoljna (Tabela 1). Eksperimentalno je ustanovljeno da je infektivnost HuNoV bolje očuvana na 4°C, nego na sobnoj temperaturi (Cannon et al., 2006), dok je veštačkom kontaminacijom malina i jagoda ustanovljena njihova infektivnost nakon 7 dana na 4 - 10°C, a do 3 dana na 21°C (Verhaelen i sar. 2012). Perzistentnost na niskim temperaturama koje se koriste za čuvanje i skladištenje zamrznutog jagodastog voća i školjki, potvrđena je na temperaturama -20°C i -80°C do nekoliko dana (Richards et al., 2012, Gibson i Schwab, 2011; DiCaprio et al., 2015a). Slična ispitivanja perzistentnosti HAV na površinama mladog luka u temperaturnom intervalu 3-24°C detektovana je na nižim temperaturama i posle 29 dana (Choi i Kingsley, 2016) dok je

perzistentnost na svežem povrću HuNoV na 4°C i 22°C oko dve nedelje (Escudero et al., 2012). Perzistentnost virusa testirana je na površinama paprike, šargarepe i zelene salate. Iako nije moguće direktno poređenje zbog različitih eksperimentalnih uslova, faktora sredine i virusa uočava se sličnost u detekciji nakon određenog perioda (Yang et al., 2018).

U različitoj ohlađenoj hrani (piletina i zelena salata) HuNoV mogu da prežive do 21 dan. Upoređujući različite matrikse hrane, bolja perzistentnost je dobijena u mesu što se objašnjava prirodom površine i protektivnim efektom proteina i masti (Mattison et al., 2007; Lamhoujeb et al., 2008; Higginbotham et al., 2014). U školjkama HuNoV su detektovani nakon 6 nedelja na temperaturi do 15°C, a 4 nedelje na 25°C (Choi and Kingsley, 2016).

Održivost HuNoV na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom zavisi od različitih faktora, kao što su vrsta materijala (nerđajući čelik, plastika, aluminijum i dr.), temperatura i relativna vlažnost (RV) (D'Souza and Joshi, 2016). Visoka RV pospešuje perzistentnost enteričnih virusa, uključujući HuNoV i bolja je u odnosu na surogate (Colas De La Noue et al., 2014). U zavisnosti od spoljašnjih faktora perzistentnost HuNoV na nerđajućem čeliku može biti do 49 dana, a na plastici 56 dana (Cannon et al., 2006; Yeargin et al., 2015; Knight et al., 2016). Na istom tipu površina u temperaturnom intervalu 4-23°C perzistentnost HAV je iznosila 16 dana (Trudel-Ferland, 2021). Na sobnoj temperaturi broj čestica HuNoV se smanjio u toku 21 - 28 dana za 1,5 - 2,9 log₁₀ u odnosu na početni broj (Liu et al., 2009).

Interakcije koje se ostvaruju između virusa i površina mogu biti specifične, i mogu da se ostvare receptorima ili nespecifičnim, elektrostatičkim i hidrofobnim vezama (Deng and Gibson, 2017). Uočeno je da hidrofobnost materijala (nerđajući čelik, plastika, jagode, zelena salata) utiče na uspostavljanje interakcija. Između nerđajućeg čelika i virusa uspostavljaju se Van der Valsove sile koje u vodi, rastvoru soli i porastom temperature slabe. Uticaj vode nakon ispiranja, kao i temperatura značajno slabe veze između površina i virusa. Adhezija na polietilen i zelenu salatu uslovljena je Luisovim (kiselo-baznim) hidrofobnim interakcijama. Ograničenja ispitivanja interakcija virusa i površine jagoda su uslovljena oblikom, neravnim površinama i samim matriksom hrane (Samandoulgou et al., 2015a; 2021b).

Iako nije u potpunosti razjašnjen način vezivanja virusa za površine, analizom protektivnog efekta lisnatog povrća, posebno naborane strukture lista zelene salate, utvrđeno je da štiti virus prilikom pranja i termičkog tretmana. Starije lisnato povrće ima bolji protektivni efekat u odnosu na mlade listove zbog kompleksnih ugljenih hidrata i sastava lista (Esseili et al., 2012). Utvrđeno je da VLP GII.4 specifično prepoznaju i vezuju se za 1,2- α -fruktozni deo ugljenih hidrata sličnih HBGA, koji su identifikovani u hemicelulozi ćelijskog zida zelene salate (Gao et al., 2016). Smatra se da ova veza pospešuje vezivanje virusa za listove.

Ispitivanjem perzistentnosti HuNoV u otpadnoj vodi i vodi za piće, utvrđena je veća stabilnost u čistoj vodi i do nekoliko meseci (Seitz et al., 2011). Niska temperatura ima uticaj na bolju održivost u vodi, pa se virusi mogu detektovati i nakon 140 dana (Kaappinen et al., 2017). Na perzistentnost virusa može da utiče sastav suspenzije u kojoj se nalazi, mada prilikom poređenja fosfatnog pufera i simulirane gastrointestinalne tečnosti u periodu od 42 dana nije bilo statistički značajne razlike (Tung-Thompson et al., 2014; Liu et al. 2012). Druga istraživanja daju prednost simuliranoj gastrointestinalnoj tečnosti gde su čestice virusa ispoljile bolju stabilnost, u odnosu na fosfatni pufer, jer su po proceni autora bile zaštićene molekulima različitih jedinjenja (Djebbi-Simmons et al., 2020).

Novija istraživanja se zasnivaju na testiranju perzistentnosti VLPs čestica i kapsida norovirusa u simuliranim gastrointestinalnim uslovima. Niska pH vrednost i enzimi (pepsin, tripsin i himotripsin) nisu izazvali oštećenja kapsida. Uticaj enzima u simuliranim gastrointestinalnim tečnostima i niska pH vrednosti prućena je degradacijom VLPs čestica (Chassaing et al., 2020). Dostupni podaci ukazuju da je HuNoV stabilniji u odnosu na patogene bakterije koje se mogu naći u hrani ili na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom. Metode koje se razvijaju u cilju sprečavanja čestih kontaminacije hrane, površina, a time i epidemija potrebno je modifikovati prema virusnim agensima.

U većem broju različitih istraživanja i testiranja rezistentnosti utvrđena su neslaganja surogata u odnosu na HuNoV. Rezistentnost surogata testirana je na UV zračenje, dezinfekciona sredstva, širok opseg temperature i pH vrednosti. Testiranja su vršena u cilju definisanja efikasnih mera dezinfekcije površina, hrane i lične higijene, odnosno sprečavanja pojave epidemija ili smanjenja broja sporadičnih slučajeva. Različite studije su pokazale da je FCV soj F9 nestabilniji u odnosu na HuNoV prilikom testiranja na niskoj pH vrednost ili pri različitim koncentracijama hlora (Cromeans et al., 2014). Blago kiseli uslovi (pH 4) i neutralni (pH 7) nisu pokazali redukcioni potencijal za MNV (Seo et al., 2012). Američka agencija za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency, EPA) odobrila je FCV za testiranje efikasnosti virucidnih sredstava (Jimenez and Chiang, 2006; U.S. Environmental Protection Agency, 2009; Whitehead and McCue, 2010).

Tabela 1. Pregled perzistencije humanog norovirusa i njegovih surogata dobijenih testiranjem u različitim uslovima.

Virus	Koncentracija	Matriks inokuluma	Površina	Temperatura (°C)	Relativna vlažnost (RV, %)	Perzistencija (dan)	
FCV HuNoV GI	10 ⁹ PFU 10 ⁴ pcr-uc	Kultura ćelije Suspenzija fecesa	Laminat (Formica) Nerđajući čelik	22 ± 2 °C	75-88%	7 dana	(D'Souza et al., 2009)
FCV MuNoV	5 x 10 ⁵ PFU	Veštačka suspenzija fecesa	Nerđajući čelik	4°C 22°C	54% 75- 88%	7 dana, redukcija > 1 log ₁₀ ; 7 dana, redukcija 2,5 log ₁₀ 7 dana, redukcija 1,5 log ₁₀ ; 5 dana	(Cannon et al., 2006)
MuNoV	10 ⁸ PFU	Kultura ćelije	Pelena od gaze	-20°C 4°C 18°C 30°C		40 dana, -20°C, 4°C redukcija 5,5 log ₁₀ PFU; 18°C, 30°C < 2 log ₁₀ PFU	(Lee J et al., 2008)
HuNoV GII	10 ² NASBA partikule particle	Suspenzija fecesa	Nerđajući čelik Plastika (PVC)	7°C 20°C 7°C 20°C	86 % 86% 30% 86% 86% 30%	49 dana; 28 dana, 7 dana 56 dana; 28 dana, 7 dana	(Lamhoujeb et al., 2009)
HuNoV GI HuNoV GII	10 ⁷ - 10 ⁹ GE	Suspenzija fecesa	Keramika Laminat (Formica) Nerđajući čelik		RV	40 dana, 0,4 -1,2 log ₁₀ redukcije 28dana, 1,5-2,9 log ₁₀ RNK redukcije	(Liu et al., 2009)
MuNoV	10 ⁵ - 10 ⁶ PFU	Kultura ćelije	Nerđajući čelik			42 dana,	(Fallahi et al., 2011)
HuNoV GI	10 ⁴ pcr-cu	Suspenzija fecesa	Laminat (Formica) Nerđajući čelik		RV	42, 1,5-2,3 log ₁₀	(Escudero et al., 2012)

Pregledom literature uočavaju se značajne razlike između ispitivanih surogata. Bolju rezistentnost prema niskoj pH ispoljio je MNV a veću osetljivost prema alkoholu u odnosu na FCV (D'Souza

and Su, 2010; Park et al., 2010; Park and Sobsey, 2011). FCV je osetljiviji na 70% alkohol u odnosu na 90% (Park et al., 2010). Dezinfekciona sredstva na bazi hlora (1000 ppm) i njegovih jedinjenja efikasna su za redukciju FCV više od 5 log₁₀ GE, dok je manja redukcija postignuta za MNV i TV. Veća osetljivost FCV zabeležena je na površinama od nerđajućeg čelika i plastike nakon tretmana sa dezinfekcionim sredstvima u odnosu na MNV. Izvedeni eksperimenati i preporuke za dezinfekciju površina koje dolaze u kontakt sa hranom ukazuju da koncentracija od 200 ppm hlora ne bi bila efikasna prema HuNoV (Predmore and Li, 2011; Zonta et al., 2015). Degradacija HuNoV VLP čestica nije postignuta tretmanom sa 200 ppm hipohlorita u trajanju od 30 i 60 s, već je redukcija ostvarena tretmanima sa 500 i 1000 ppm posle 60 i 180 s (Sato et al., 2016). Prema preporuci CDC i SZO koncentracija 1000-5000 ppm natrijum hipohlorita (NaOCl) dovoljna je da inaktivira HuNoV nakon epidemije (Zonta et al., 2015). Međutim, dezinfekciona sredstva na bazi hlora gube svoju efikasnost u kontaktu sa povećanom koncentracijom organskih materija, što predstavlja problem prilikom dekontaminacije površina gde je došlo do povraćanja ili dijareje (Chitnis et al., 2004). Novija ispitivanja dezinfekcionog sredstva na bazi vode i hlorne kiseline (chlorous acid water, CA) u koncentraciji od 200 ppm može da inaktivira FCV > 4 log₁₀ u prisustvu proteina, dok je ista koncentracija u odsustvu organskih materija redukovala HuNoV GII.4 i GII.2 nakon 30 minuta > 3 log₁₀ (Goda et al., 2021).

Iako većina testiranih dezinfekcionih sredstava redukuje surogate, HuNoV je često rezistentan na komercijalna dezinfekciona sredstva ili bar u koncentracijama u kojima se uobičajeno koriste za eliminaciju bakterijskih patogena. Jedan od primera je etanol koncentracije 70% i 90% koji nema redukcionu moć prema HuNoV (Kim et al., 2011). Efikasno dezinfekciono sredstvo je natrijum hipohlorit koji u visokim koncentracijama uspešno redukuje HuNoV. Rezistentnost HuNoV na rezidualni hlor dobijena je pri koncentraciji 0,5-1 mg/mL (Park i Sobsey, 2011, Akasaka et al., 2016). Dezinfekciono sredstvo na bazi natrijum hipohlorita i vodonik-peroksida registrovano je kao efikasno protiv HuNoV (EPA, 2009). Surogati HuNoV su, takođe inaktivirani visokom koncentracijom natrijum-hipohlorita (5000 ppm) na poroznim i neporoznim površinama, dok MNV pokazao rezistentnost na vodonik-peroksid (2656 ppm). Iako su surfaktanti smatraju se neefikasnim prema virusima bez ovojnice, mada mogu izazvati oštećenja kapsida (Yeargin et al., 2015). Generalno, virusi bez ovojnice su rezistentniji prema mnogim ispitivanim sredstvima u odnosu na viruse koji imaju ovojniciu u svom sastavu. Dezinficijens na bazi vodonik-peroksida redukovao je reoviruse i u visokim koncentracijama uspešno redukovao FCV. Na dekontaminaciju površina značajno utiču karakteristike dezinficijensa i kontaktno vreme (Li et al., 2011).

Dezinfekciono sredstvo za ruke na bazi alkohola, 2% limunske kiseline i uree, pokazalo se efikasano prema MNV, adenovirusu i poliomavirusu (Ionidis et al., 2016). Prema Evropskim standardima virucidno sredstvo za ruke smatra se efikasnim ukoliko postigne redukciju za 4 log₁₀ u odnosu na početni broj čestica (EN 14476:2013/A1:2015; Tuladhar et al., 2015).

Jedna od novijih metoda dekontaminacije je kombinovanje pare i ultrazvuka (engl. steamultrasound) koje se pokazalo kao efikasno prema MNV kao kontaminentu površina (plastika i nerđajući čelik) i malina (Rajiuddin et al., 2020). Takođe, netermička tehnika visoki hidrostatički pritisak (High hydrostatic pressure, HHP), koja se primenjuje za zaštitu prehrambenih proizvoda kao što su džemovi, gotova jela od mesa, sokovi i dr., omogućila je inaktivaciju HuNoV GI i GII, kao i njegovih surogata. Prilikom inaktivacije HuNoV GI i GII ovom tehnikom značajan uticaj ima primenjena temperatura. Pri 21-35°C virusi su pokazali rezistentnost, dok je značajna redukcija dobijena na nižim temperaturama 1-4°C. Slični rezultati su zabeleženi i prilikom testiranja dejstva HHP na redukciju MNV na površini zelenog luka, kada je prisustvo vode na 4°C poboljšalo inaktivaciju, dok na 20°C nije bilo efekta. Ovim se potvrdio značaj temperature pri izvođenju HHP tehnike, koja je obezbedila redukciju MNV > 3 log₁₀ na 1°C (Sido et al., 2017). Drugi važan faktor koji može imati uticaja na primenu HHP jeste pH sredine, jer su virusi pokazali veću rezistentnost u kiseloj (pH 4) nego u neutralnoj sredini. Razvijanje novih tehnika dekontaminacije HuNoV sa površina koje nisu štetne po zdravlje ljudi, pokazale su se kao efikasne, ali nisu u velikoj meri

zastupljene u prehrambenoj industriji, ili nisu još uvek odobrene za širu upotrebu (Sido et al., 2017; Rajiuddin et al., 2020).

2.1.6. Putevi prenosa

Infekcije humanim norovirusima se mogu proširiti oralno-fekalnim putem, direktnim kontaktom sa inficiranom osobom ili indirektno preko kontaminirane hrane i vode, površina, ruku, unakrsnom kontaminacijom i aerosolom tokom povraćanja. U ustanovama zatvorenog tipa, kao što su domovi za negu starih lica, bolnice, vojni objekti i veliki turistički brodovi kruzери, kontaminirane površine predstavljaju značajan izvor HuNoV što posledično može uzrokovati pojavu epidemija. Površine se mogu direktno kontaminirati preko ruku, aerosolom prilikom povraćanja ili dijareje inficirane osobe, nakon čega postaju sekundarni izvor infekcije norovirusa. Preko kontaminiranih površina HuNoV se mogu preneti na čiste ruke, nakon toga na brave, telefon i druge predmete koji često dolaze u kontakt sa ljudima. Generalno, unakrsna kontaminacija površina i hrane predstavlja ozbiljan problem kao izvor pojedinačnih slučajeva infekcije ili epidemija izazvanih HuNoV i drugim patogenima (Assab and Temime, 2016).

Čestice HuNoV se mogu preneti preko vazduha, prilikom projektilnog povraćanja u toku bolesti, predstavlja i jedan od karakterističnih simptoma. Hrana može da se kontaminira fekalno-oralnim putem, a jedan od važnih prenosioca i visok rizik predstavljaju ruke radnika koji rukuju hranom (Hardstaff et al., 2018; Watson i Gong, 2018), kao i površine koje dolaze u kontakt sa hranom. Surogati MNV kao i bakteriofagi MS2, ali i drugi brojni virusi mogu se preneti sa stakla, poliestra, pamuka i drugih materijala u značajnoj koncentraciji na hranu (Lopez et al., 2015). Bez svake sumnje od esencijalnog značaja je održavanje adekvatne lične higijene, posebno nakon upotrebe toaleta. Prilikom poređenja stepena kontaminacije sa rukavica i prenošenja na zelenu salatu i jagodasto voće, utvrđeno je da se od ukupne koncentracije, veći deo prenosi na površine (Verhaelen et al., 2013). Još jednom, značajano je istaknuti da je jedan od puteva prenosa HuNoV unakrsna kontaminacija (Slika 7) preko površina za pripremu hrane, daske za sečenje, noževa, rukavica, odeće ili putem direktnog kontakta inficirane osobe sa hranom (Karst, 2010).

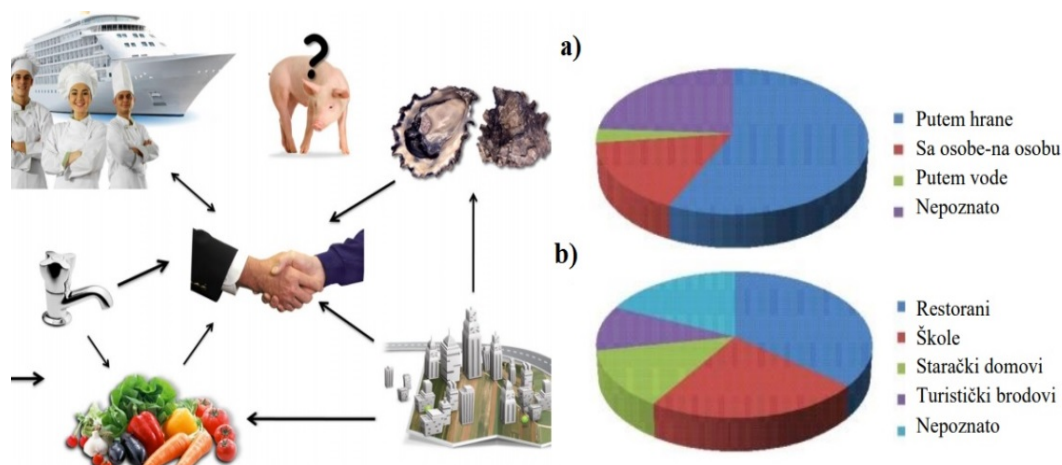
Kategorija hrane koja se podrazumeva pod terminom hrana spremna za konzumiranje, kao i katering, hrana pripremljena za švedski sto, školjke (dagnje), jagodasto voće (kupine, maline, jagode) i sveže povrće (najčešće lisnato) može se kontaminirati lako u bilo kom koraku primarne proizvodnje, prerade, distribucije i uopšte manipulacije (Radin, 2012). Navedene kategorije se smatraju kao hrana visokog rizika, jer se u najvećem broju slučajeva konzumiraju sveže, bez ikakvog termičkog ili nekog drugog tretmana, ili tretirana kratkim termičkim tretmanom.

Najčešće kontaminirano sveže povrće sa HuNoV je zelena salata, mladi luk ili mešana salata (Herman et al., 2015). Procenjuje se da je lisnato povrće kontaminirano sa oko 55% norovirusa, 15% sa Shiga toksin produkujućom *Esherichia coli* (STEC) i 11% sa bakterijom *Salmonella*. Smatra se da se čak do 85% kontaminacija povrća dešava prilikom njihove pripreme u restoranima ili ugostiteljskim objektima. Kao što je već istaknuto, osoblje koje rukuje hranom predstavlja osnovni vektor prenosa ili izvor kontaminacije. Prevencija kontaminacije svežeg povrća mora da se sprovodi od polja (sistema za navodnjavanje) do pripreme i seviranja.

Jagodasto voće, kao što su maline i borovnice, zbog prirode samog ploda i osetljive manipulacije najčešće su kontaminirani HuNoV (Hall et al., 2014; Müller et al., 2014; Ayukebong et al., 2015). Zbog kratkog roka trajanja ova kategorija voća se u najvećem broju slučajeva i velikim količinama zamrzava. Do kontaminacije HuNoV može doći prilikom berbe, neposredno pre zamrzavanja i nakon odmrzavanja. Prevencija kontaminacije jagodastog voća je od posebnog ekonomskog značaja zbog velikog udela ove kategorije zamrznutih proizvoda u izvozu.

Infekcije HuNoV mogu se javiti u svim starosnim kategorijama, a simptomi se razlikuju u zavisnosti od populacije, starosti, imunološkog statusa. Postoje razlike u epidemiologiji genotipova HuNoV što se može objasniti posledicom evolucije i prilagođavanja domaćinu (de Graaf et al.,

2016). Dijagnoza o infekciji HuNoV vršena je na osnovu kliničke slike i predhodne analize na patogene bakterije, trajanja bolesti (dominatni simptomi dijareja i povraćanje).



Slika 7. Putevi prenosa humanog norovirusa (Karst, 2010, <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/norovirus-factsheet.htm>)

Za kliničku detekciju uglavnom se koriste imunološki testovi (kao što su ELISA i imunoelektronska mikroskopija) korišćenjem antitela protiv poznatih genotipova HuNoV. Metod koji je dostupan u svim laboratorijama ili bolnicama je ELISA test koji se koristi za dijagnostiku virusnih antigena, ali jedan od ozbiljnih nedostataka je ograničena osetljivost detekcije, i dodatno efikasnost ovog testa iznosi 55%. Ranije se, tradicionalno, za dijagnostiku koristila imunoelektronska mikroskopija koja zahteva visok broj virusa u gramu fecesa (oko 10^6) (Atmar et al., 2008; Allen et al., 2016). Ove metode su pogodne za kliničke uzorke kod kojih je titar virusa visok, ali nisu prikladne za otkrivanje niskog broja virusa koji se obično nalazi u uzorcima hrane.

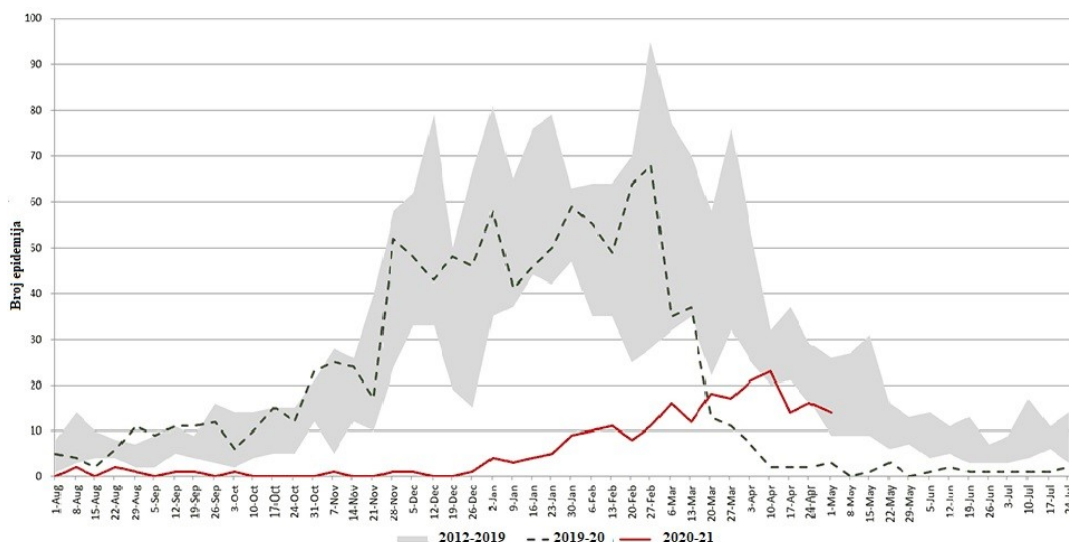
Izazovi povezani sa otkrivanjem malog broja HuNoV-a i drugih virusa u hrani uključuju koncentraciju uzorka, prečišćavanje uzorka i ekstrakciju nukleinske kiseline uz istovremeno uklanjanje inhibitora koji mogu negativno uticati na dalju detekciju. Savremena, brza i osetljiva metoda koja se naziva i „zlatni standard“ jer može detektovati RNK virus u niskoj koncentraciji, jeste lančana reakcija polimeraze kojoj predhodi reverzna transkripcija (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) (D'Souza i Joshi, 2016). Savremeni trenutak, pojava i trajanje pandemije Covid-19, imao je doprinos u usavršavanju ove metode, pre svega postala je dostupna u mnogim laboratorijama i bolnicama. U epidemiološkim istraživanjima značajno je određivanje genogrupa i genotipova, kao i dobijanje brzih podataka o izvoru kontaminacije (Tahamtan i Ardebili, 2020).

Metode zasnovane na izotermnoj amplifikaciji nukleinske kiseline predstavljaju nov pristup za brzu detekciju virusa u hrani, pri čemu se eliminiše potreba za skupom opremom koja se koristi za PCR. Međutim, smatra se da je, trenutno, tehnologija sekvenciranja nove generacije (eng. next generation sequencing) i sekvenciranja celog genoma (eng. whole genome sequencing) najkorisnija molekularna metoda koja omogućava prikupljanje informacija o patogenu na nivou nukleinske kiseline i da će biti osnov za epidemiološka istraživanja alimentarnih epidemija. Epidemiološki podaci koji povezuju infekcije sa specifičnim uzorcima hrane, ključni su za suzbijanje i lečenje oboljenja koja se prenose hranom.

2.1.7. Epidemiološki podaci i klinička slika norovirusne infekcije

Prema zvaničnim podacima CDC, između 65-85% slučajeva gastroenteritisa izazvano je HuNoV na teritoriji SAD, Evrope i Japana. Najnoviji podaci ukazuju da je najmanji broj prijavljenih slučajeva HuNoV u periodu 2020-2021 (Bartsch et al., 2020; CDC, 2021), što se pripisuje pandemiji koronavirusom (Slika 8). Na osnovu dostupnih podataka može se zaključiti da se u regionima sa umereno-kontinentalnom klimom pojedinačni slučajevi i epidemije javljaju pretežno u zimskim

mesecima, što se može objasniti bliskim kontaktima među osobama u zatvorenim prostorima, izraženom kontaminacijom kontaktnih površina ili hrane. U SAD, uzročnici oko 50% alimentarnih epidemije su HuNoV. Najviše HuNoV epidemija povezano je sa restoranima i osobama koje rukuju hranom (Hall et al., 2013; Ahmed et al., 2014).



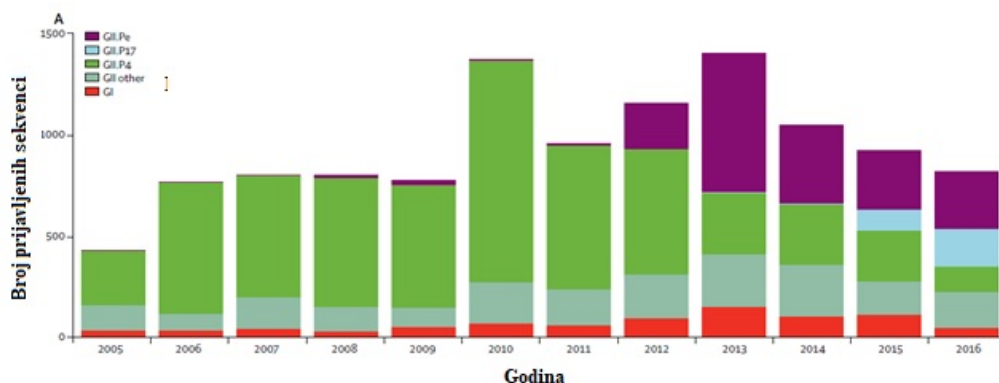
Slika 8. Period pojave norovirusnih epidemija od 2012-2021 (CDC, 2021).

HuNoV su odgovorni za epidemije koje se javljaju i u drugim okruženjima, kao što su domovi za negu starih lica, a na brodovima kruzerima (rečnim i preokookeanskim) izazivaju i do 90% oboljenja, zbog čega je nazvan „virusom krstarenja“ (Lee et al., 2010; Allen et al., 2016).

Potrebno je još jednom da se skrene pažnja na činjenicu da do kontaminacije hrane može doći u bilo kojoj fazi proizvodnje od gajenja, đubrenja, zalivanja, berbe, finalne obrade do serviranja. Dodatni momenat koji treba istaći je savremeno globalno snabdevanje hranom. U tom smislu, jedna od velikih epidemija, koja svakako zaslužuje pažnju da se detaljnije pomene, izazvana je zamrznutim jagodama kontaminiranim HuNoV (uvoz iz Kine) kada je registrovano oko 11000 obolelih (dominantno školska deca) od norovirusnog gastroenteritisa (Nemačka, 2012) (Mäde et al., 2013). Slično, može se pomenuti slučaj epidemije norovirusnog gastroenteritisa u Severnoj Italiji i Nemačkoj, izazvane kontaminiranim zamrznutim jagodastim voćem (mešavine malina, kupina i jagoda) uvoz iz Kanade, Bugarske, Srbije i Poljske (Bozkurt et al., 2020).

Do sada, infekcije ljudi životinjskim norovirusima nisu prijavljene. Međutim, neka istraživanja su ukazala na moguću transmisiju norovirusa među različitim vrstama domaćina što je dovelo do njihovog otkrića u fecesu goveda, svinja i pasa (de Graaf et al., 2016).

Veliki napredak u praćenju epidemioloških podataka omogućilo je formiranje neformalne međunarodne mreže (NoroNet) 2002. godine, koja predstavlja platformu za razmenu podataka o epidemija norovirusa, njihovoj genetičkoj raznovrsnosti, primenjenim molekularnim metoda itd. NoroNet je obezbedio sekvence kojima norovirus može da se identifikuje do nivoa genogrupe i genotipa, što ovu bazu čini brzom i pouzdanom. Generalno, HuNoV GII.4 genotip godinama dominira širom sveta i odgovoran je za oko 70% epidemija akutnog gastroenteritisa kod ljudi svih starosnih kategorija (Motoya et al., 2017; Siqueira et al., 2017; Sato et al., 2017). Analizom norovirusnih sekvenci u periodu od 2005-2016, analizirano je 16 635 sekvenci koje su izazvale epidemije u 19 zemalja sa dominantnim uzročnikom GII.4, a u periodu 2015-16 u porastu je uzročnik GII.P17 i GII.17 (Slika 9) (Hall et al., 2011; van Beek et al., 2018; Burke et al., 2018).



Slika 9. Broj prijavljenih sekvenci prema genogrupi, genotipu i godini (van Beek et al., 2018).

Klinička slika norovirusnog gastroenteritisa se manifestuje učestalom vodenastom dijarejom, povraćanjem, ponekad praćenim povišenom temperaturom, usled dehidracije. Norovirusom se mogu inficirati sve kategorije ljudi, a najosetljivije grupe su deca mlađa od 5 godina, imunokompromitovani i starije osobe. 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. Oboljenje najčešće traje 2-3 dana. Najčešće komplikacije se javljaju usled dehidracije, bubrežne insuficijencije, intravaskularne koagulacije i hronične dijareje koja može trajati i nekoliko meseci. Smrtni slučajevi zabeleženi su uglavnom među osobama starijim od 65 godina. Iako bolest traje samo par dana, izbacivanje virusa se može nastaviti i do 60 dana nakon prestanka simptoma. Procenjuje se da svaka osoba u svom životu prosečno oboli bar pet puta od norovirusa (Glass et al., 2009; Richardson et al., 2013; Burke et al., 2018; Bartsch et al., 2020). Takođe, pretpostavlja se da oko 20-30% ljudi ima asimptomatsku infekciju HuNoV (Qi et al., 2015). Podaci dostupni u literaturi ukazuju da imunitet nakon infekcije traje od nekoliko nedelja do dve godine. Rezultati studija koje su uključivale ljude pokazuju da imunitet može trajati do nekoliko godina protiv istog soja (Simmons et al., 2013).

Jedna od najvažnijih prepreka u razvoju vakcine je da do skoro HuNoV nije mogao da se gaji u kulturi ćelija domaćina. Prve pripremljene vakcine, zasnivaju se na VLP genotipa GI.1 ili u slučaju bivalentne vakcine, sadrže dodatno pored navedenog VLP genotipa GII.4. Klinička ispitivanja na zdravim volonterima pokazala su pojavu indikacije imunološkog odgovora (stvaranje antitela) bez obzira na način davanja vakcine (oralno, intramuskularno, intranazalno). Nakon vakcinacije sproveden je kontakt sa GII.4, ali bolest i njena učestalost nije izostala, ali je smanjena incidenca i ozbiljnost povraćanja i dijareje. Zbog velike genetičke raznovrsnosti HuNoV smatra se da će vakcina morati da se adaptira svake 2-3 godine, slično vakcinama protiv gripa (Kocher and Yuan, 2015; Baehner et al., 2016; de Graaf et al., 2016; Cates et al., 2020).

2.2. Nar (*Punica granatum* L.)

2.2.1. Potencijal ploda nara (*Punica granatum* L.)

Nar (*Punica granatum* L.) je drevna drvenasta listopadana biljka iz familije Lythraceae (Graham et al., 2005). Međutim, često se klasifikuje u sopstvenu porodicu Punicaceae, rod *Punica* sa još jednom vrstom istog roda *Punica protopunica* (Zukovskij, 1950; Levin, 2006; Holland et al., 2009). Plod *P. protopunica* je roze boje i veći, dok je plod *P. granatum* crveni, manji i manje slađi. Vrsta *P. granatum* obuhvata više od 1000 sorti (Mars, 2000). Latinsko ime roda *Punica* potiče od porekla najboljih plodova u području Punije (Kartagina, današnji Tunis), a ime vrste *granatum* ukazuje na karakteristiku ploda, odnosno zrna (Khadivi et al., 2018).

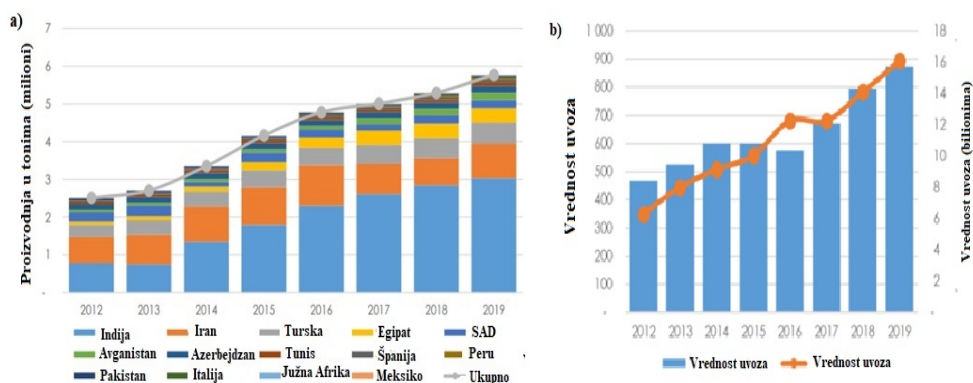
Nar su gajile mnoge kulture hiljadama godina, zbog čega se tačno poreklo ne može odrediti (Stover, 2007), ali se smatra da nar potiče sa Bliskog istoka (Levin, 2006). Tradicionalno i u literaturi naziva

se različitim imenima: šipak, mogranj, granat, kalinka, zrnasta jabuka. Izgled nara je specifičan sa prepoznatljivom „krunom“ na vrhu ploda (Slika 10). Koloracija kore u zavisnosti od vrste može da bude jarko crvene do sivkasto-crvene boje. Pitomi nar je veličine veće jabuke, sočniji i slađi u odnosu na divlji (Holland et al., 2009). Stabiljka nara raste do 5 m, pod određenim uslovima može da naraste i do 7 m kao grm ili niža biljka (Levin, 2006). Mlade grane iz vegetativnog rasta su tanke i mnogobrojne tamno zelene, kako biljka sazreva tako boja postaje svetlija (Goor i Liberman 1956). Specifičnost stabiljke nara koja je dobijena iz semena, u odnosu na druge biljke pripadnika Rosaceae je da već od druge godine rasta mogu da daju plodove, dok većina sadnica cveta, a plodove daju treće godine. Optimalni klimatski uslovi za uzgoj nara su velika izloženost sunčevoj svetlosti i zime sa temperaturom ne nižom od 12°C (Terakami et al. 2007). Sorte nara se klasifikuju prema procentu šećera i kiselina: slatki, slatko-kisel i kisel. Divlji nar je sitniji i po ukusu kiseliji. Plod se koristi kao svež ili prerađen (sok, džem, žele, boja i aroma za hranu). Međutim, loše rukovanje narom posle branja i tokom obrade često rezultira smanjenim kvalitetom ploda, gubitak mase, boje i ukusa (Fischer et al., 2011; Fawole i Opara, 2013).



Slika 10. Izgled različitih sorti nara (Evropski nar-levo i Barski slatki nar-desno) <https://www.alternativnamedicina.rs/nar/>

Nar se uzgaja širom sveta i zemlje koje ga najviše proizvode su: Indija, Iran, Tunis, Turska, Kina, Izrael, Španija, Egipat, Brazil i mnoge druge. Uspešno se uzgaja i na području Mediterana i smatra se da je najbolji nar sa područja Bara. U svetu proizvodnja nara 2014. iznosila je oko 3 miliona tona, a 2017. je porasla na 3,8 miliona tona (Slika 11). Vodeća zemlja u proizvodnji je Iran, a slede Indija, Kina, Turska i SAD (Kahramanoğlu, 2019). Tačni statistički podaci za ukupnu globalnu proizvodnju nara nisu dostupni jer Organizacija za hranu i poljoprivredu (Food and Agriculture Organization, FAO) trenutno u svojoj bazi ne vodi evidenciju o proizvodnji nara ni za jednu zemlju. Prema zvaničnom izveštaju za izvoz/uvoz svežeg voća i povrća u Evropi 2019/20, nar kao svež proizvod nije obuhvaćen statistikom Evropskih zemalja (European Statistics Handbook-Fruit Logistica 2020). Globalno tržište nara i njegovih nejestivih frakcija procenjeno je na 8,2 milijarde dolara i smatra se da će dostići 23,14 milijardi do 2026. Nezvanični podaci globalne proizvodnje nara ukazuju da je proizvodnja iznosila 236,8 miliona dolara za 2020 godinu. Kina je trenutno najveće tržište potrošnje nara tokom godine. Povećana je potražnja za proizvodima u obliku ekstrakta, soka, funkcionalnog pića, suplemenata, kozmetičkih preparata što predstavlja jedan od glavnih faktora koji pokreću razvoj globalnog tržišta nara. Svaki deo biljke, koren, kora, drvo, klica, cvet, lišće, plod i seme ima ekonomsku vrednost koji sa godinama dobija sve veću cenu na tržištu (Global Pomegranate Sales Market Report, 2020; CBI, 2020).



Slika 11. a) Globalna proizvodnja nara 2012-2019 (Pienaar et al., 2021), b) Porast vrednosti uvoza nara 2012-2019 (ITC, 2020)

Plod nara se sastoji od jestivih i nejestivih delova. Svi delovi osim crvenog mezokarpa oko semena su nejestivi i smatraju se otpadom. Jestivi deo biljke čini oko 48-52%, od toga 78% soka i 22% semenki (Mphahlele et al., 2016). U zavisnosti od sorte nara, kora čini oko 26-67% mase ploda (Al-Said et al., 2009; Zarei et al., 2010). Plod može da sadrži 120 fitohemijskih jedinjenja koja imaju antiinflamatorni, antioksidativni, pozitivan uticaj na jačanje imuniteta i druge benefite. Među najznačajnijim fitohemijskim jedinjenjima izdvajaju se polifenolne komponente, punikalagin, elagna kiselina, derivati antocijana (delfidin, cijanidin, pelargonidin 3-glikosid 3,5 diglikosid) (Ismail et al., 2012). Zdravstvene, funkcionalne i druge prednosti ploda nisu ograničene samo na jestive delove nara. Nejestive frakcije nara (kora, seme, cvet, pupoljci, list) se smatraju nus proizvodima i često se odbacuju, tj. ne koriste se za dalju preradu u mnogim industrijama i u svakodnevnoj ishrani (Sreekumar et al., 2014; Akhtar et al., 2015).

Komponente i proizvodi od nara imaju antioksidativni, antimikrobni, antikancerogeni i protiv upalni efekat (Asgary et al., 2014; Orgil et al., 2014). Smatra se da je antioksidativni potencijal soka nara veći od potencijala crvenog vina i zelenog čaja. Mediji širom sveta nar su klasifikovali kao „super voće“, zahvaljujući mnogim zdravstvenim prednostima, uključujući visok nivo punične kiseline, vitamina C i antioksidanata (Danesi i Ferguson, 2017; Kojadinovic et al., 2017). Mnogi potrošači se okreću zdravijem načinu života, uključujući konzumiranje nara i njegovih proizvoda što je doprinelo skoku ekonomske vrednosti ploda (Slika 12).



Slika 12. Popularni delovi nara koji se konzumiraju: a) plod b) ekstrakt c) seme d) kora (Ismail et al., 2012).

2.2.2. Proizvodi od nara kao prirodni aditivi i funkcionalna hrana

Funkcionalna hrana od nara, pored svežeg ploda postala je popularna širom sveta. Proizvodi koji se mogu naći na tržištu su matični sok od nara (pomegranate juice, PJ), ekstrakti kore, lista, ulja semena, džemovi, razni kozmetički proizvodi i suplementi (Slika 13).



Slika 13. Globalana proizvodnja nara i vrste njegovih proizvoda u 2020. godine (<https://east-fruit.com/en/news/is-pomegranate>).

Povećanoj potražnji navedenih proizvoda idu u prilog istraživanja koja potvrđuju njihove zdravstvene benefite. Matični sok od nara je postao popularan širom sveta kao napitak koji doprinosi boljem funkcionisanju organizma. Matični sok se deklarira kao prirodan i sastoji se od 100% ploda sa minimalnim stepenom obrade, čime predstavlja bogat izvor različitih polifenolnih jedinjenja. Matični sok od nara pored prijatnog ukusa konzumira se kao dodatak ishrani u prevenciji pojave anemije i predstavlja bogat izvor vitamina C. Redovnim konzumiranjem matičnog soka od ploda nara potvrđena je bolja apsorpcija gvožđa zbog fitohemijskih jedinjenja koja poboljšavaju biorazgradivost. Tokom proizvodnje soka industrija odbacuje značajne količine otpada u obliku kore za koju je predloženo da bude dodatak hrani za životinje. Različita istraživanja su ukazala na mogućnost primene kore nara. Derivati nara se koriste kao boje i pojačivači za hranu (Balasubramani et al., 2020). Zahvaljujući bogatom hemijskom sastavu kora ploda nara može da se koristi kao vredan sastojak hrane koji može lako da zameni ili dopuni mikro i makronutrijente kao što su minerali, vitamini, β -karoteni, kompleksni polisaharidi, redukujući šećeri i vlakna (Shabtay et al., 2008; Viuda-Martos et al., 2011). Primena ekstrakta kore ploda nara (*pomegranate peel extract*, PPE) testirana je u proizvodnji sladoleda, uočen je povećan antioksidativni kapacitet, poboljšane su senzorne karakteristike, ukupan sadržaj polifenola i nije imao negativan uticaj na rast probiotske bakterije *Lactobacillus casei*. Dodatkom PPE ribljim konzervama povećava se njihova stabilnost, odnosno sprečava oksidacija lipida (Viuda-Martos et al., 2011; Çam et al., 2013). Oksidacija je proces koji se dešava prilikom proizvodnje i skladištenja hrane bogate lipidima. Negativan uticaj ovog procesa se odražava na nutritivne i organoleptičke karakteristike hrane. U prehrambenoj industriji najčešće se dodaju neorganska jedinjenja u cilju sprečavanja oksidacije masti i ulja. Međutim, brojne studije dovode u pitanje njihovu zdravstvenu bezbednost. Podaci ukazuju na njihove negativne uticaje na zdravlje ljudi, zbog čega je povećano interesovanje za prirodnim antioksidantima, kao što su askorbinska kiselina i tokoferol. Nedavne studije ukazale su na potencijal PPE kao efikasnog antioksidativnog sredstva. Dodatak PPE i PJ u proizvode od mesa značajno utiče na produžetak roka trajanja (Frost i Sullivan, 2013). Implementiranjem PPE u meso škampa produžen je rok trajanja, smanjena je oksidacija i inhibicija rasta *Staphylococcus* spp. (Paari

et al., 2011). Antioksidativna aktivnost PPE potvrđena je nakon dodatka dealkoholizovanim crvenim vinima (Tárrega et al., 2013; Wasila et al., 2013) i džemu (Ventura et al., 2013). Utvrđeno je da se implementiranjem PPE u hranu poboljšavaju njene nutritivne, hemijske i mikrobiološke karakteristike (Ismail et al., 2014; Ismail et al., 2019). Ekstrakt kore nara u suspenziji je perzistentniji na uslove skladištenja, sterilizacije i hlađenja što pospešuje njegove karakteristike kao aditiva hrane (Qu et al., 2012; Ahmad et al., 2013).

Takođe, i ekstrakt semena nara je pokazao značajan efekat u prevenciji kardiovaskularnih, inflamatornih i malignih oboljenja. Na osnovu farmakološke aktivnosti i zdravstvenih prednosti većina proizvoda od nara je registrovana za upotrebu (Riddle i Walker, 2016). Pored ploda nara, u lekovite delove se ubraja koren, cvet, kora ploda i drveta. U prehrambenoj industriji plod nara se može naći u različitim oblicima i u sklopu drugih proizvoda. Plod nara se u tradicionalnoj medicini koristi kao anhelmintik i antidijaroik. Kora ploda nara se u tradicionalnoj medicini primenjuje kod bronhitisa, groznice, gastrointestinalnih poremećaja, infekcija respiratornog trakta, spolja kod ozleđene kože, athelmintik i dr. Eksperimentalna farmakologija ispituje njegovu antimikrobnu, antiparazitarnu, antivirusnu, antiulcernu, imuno i antidijarejalnu aktivnost. Usitnjena kora nara se primenjuje oralno u obliku dekokta ili ekstrakta i preporučene doze ne smeju prekoračiti. Neželjeni efekti usled visoke koncentracije tanina su iritacija sluzokože želuca. Tradicionalna primena kore nara stabla i korena se bazira na dejstvu taninina i alkaloida zbog čega se koristi kao adstringens kod bolova u grlu, protiv dijareje i dizenterije, bolesti izazvanih pantljičarom i drugim crevnim parazitima (anthelmintik). Ukoliko se prekorači propisana doza i usled većeg sadržaja alkaloida može se javiti trovanje sa sledećim simptomima: povraćanje, kolaps, vrtoglavica, tremor, oštećenje vida. Ukoliko se konzumira u visokim dozama dolazi do prestanka disanja i do smrti. U okviru eksperimentalne farmakologije kora stabla i korena ispitivana je na antimikrobnu, anthelmintičnu, antiuremičnu, kancerogenu, mutagenu aktivnost i aktivnost na fertilitet. U savremenoj medicini nar i njegovi delovi nisu registrovani kao lekovi, ali se mogu kupiti u apoteci kao suplementi ili u obliku nekih drugih proizvoda (Thomson and Montvale., 2004; WHO, 2009)

2.2.3. Hemijski sastav nara

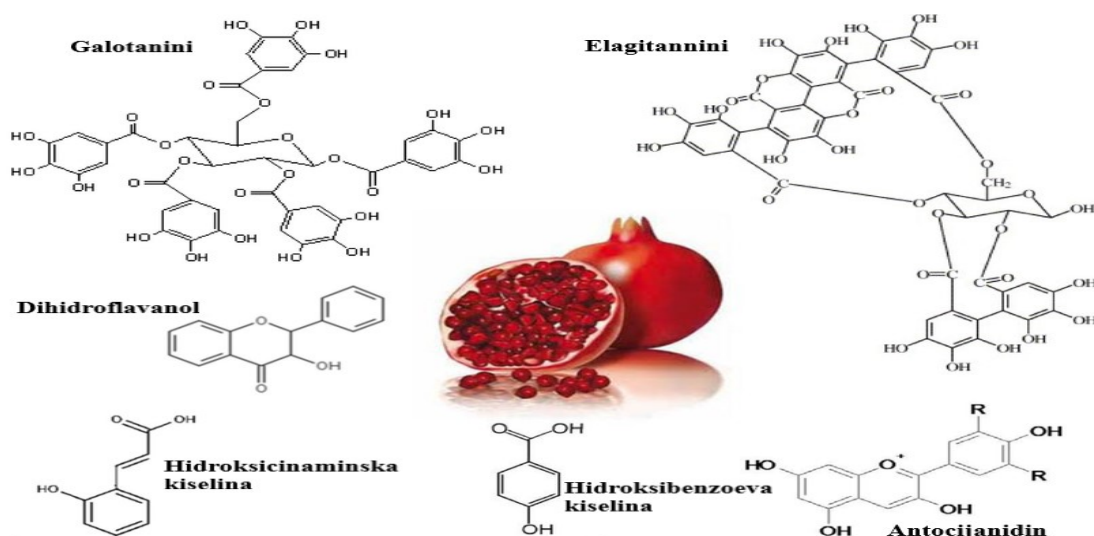
Biljka nar (*Punica granatum* L.) je detaljno opisana u monografijama *Physicians' Desk Reference*[®] (PDR) for Herbal Medicines (2004) i *WHO Monographs on Selected Plants* (2009). Prema navedenim monografijama zbog različitih biološki aktivnih jedinjenja i u različitim koncentracijama lekoviti delovi nara (biljna droga) su koren, kora, plod, kora ploda i cvetovi.

Kora stabla i korena nara (*Granati cortex*) se sastoji od tanina (20-25%, galotanin): punikalagin, punikakortein C, kazuarin. Piperidinski alkaloidi se nalaze 0,4% u kori stabla do 0,8% u kori korena). Glavni alkaloidi su isopeletierin, N-metilpeletierin, pseudopeletierin.

U plodu nara (*Granati fructus*) su dominantno zastupljeni: tanini (25-28%, galotanini), uključujući punikalin (granatin D), punikalagin (granatin C), granatin A, granatin B.

U kori ploda nara (*Granati perikarpium*) se nalaze dominantno, hidrosolubilni elagitanini i drugi polifenoli. Kora ploda nara čini oko 30-50% ukupne mase ploda. Dominatna fitohemijska jedinjenja kore i ploda su flavonoidi (flavonoli, flavanoli i antocijani), kondezovani tanini (pro-antocijanidi) i hidrosolubilni tanini (elagitanini i galotanini) (Slika 14) (Thomson and Montvale., 2004; WHO, 2009; Fischer et al., 2011; Stojanović et al., 2017). Kora nara je bogata vitaminima i mineralima kao što su A, B6, C, E, folati, kalijum i oksalna kiselina (Mirdehghan and Rahemi, 2007). Sadržaj i koncentracija flavonoida su određeni sortom i uslovima gajenja. Flavonoidi kao što su katehol, katehini i epigalokatehin daju crvenu boju kori i plodu nara. Jedan od glavnih parametra na osnovu kojih se može odrediti vizuelno koncentracija bioaktivnih jedinjenja je boja kore, koja može da varira. Tamno crvena boja kore nara je bogatija bioaktivnim jedinjenjima. Takođe, prisutna su i druga fitohemijska jedinjenja kao što su organske i fenolne kiseline, triterpenoidi i alkaloidi. Pored galne i elagne identifikovane su i druge primarne fenolne kiseline: kafeinska, hlorogena, ferulna,

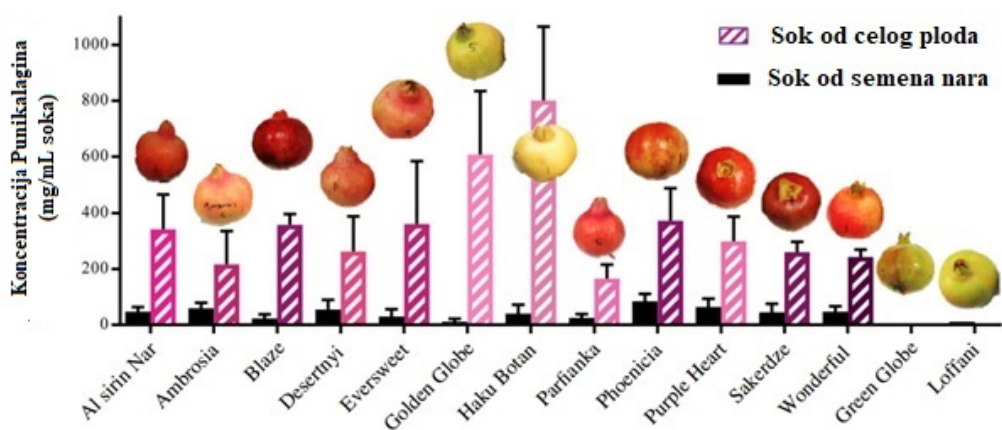
vanilinska, p-kumarna, siriginska i cimetna kiselina. Koncentracija fenolnih kiselina znatno varira u zavisnosti od geografske lokacije, klimatskih uslova i prakse kultivacije (Elfalleh et al., 2011; Elsherbiny et al., 2016; Arun et al., 2016; Alexandre et al., 2019).



Slika 14. Hemijski sastav nara (Syed et al., 2013).

U kori nara se nalazi oko 30% antocijana od ukupnog sadržaja u celom plodu. Analizom ekstrakta kore nara izdvojeno je 16 glavnih fenolnih komponenti. Fenolna jedinjenja se mogu klasifikovati u šest osnovnih kategorija: hidroksicinamska, hidrosolubilni tanini, hidroksibenzoeva kiselina, hidroksibutandijonska, hidroksicikloheksan karboksilna kiselina i hidroksifenili. Uloga koju će imati hidrosolubilni tanini ili flavanoidi definisana je hemijskom strukturom. Generalno, relativna oksidativna snaga PPE može se pripisati flavonoidima čija je efikasnost uslovljena konfiguracijom i brojem hidroksidnih grupa. Koncentracija i aktivnost hidrosolubilnih polifenola kore su u većem procentu u odnosu na druge delove ploda. U hidroksifenile svrstane su galna, elagna, jabučna kiselina, kvercetin, kempferol, a u nekim vrstama luteolin i galaginska (Middha et al., 2013; Abid et al., 2017).

Izraženu antioksidativnu aktivnost imaju punikalin, punikalagin elagna i galna kiselina koja se ispoljava sinergističkim efektom (Singh et al., 2018). Punikalagin (Slika 15) je deo porodice elagitanina, u koju su svrstani i manji molekuli tanina kao što je punikalin i galna kiselina koja se dobro rastvara u vodi. Monomerni hidrosolubilni tanini (telimagrandin I, corilagin, strictinin) imaju izraženiju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa oligomernim taninima, dimernim i trimernim procijanidima (Li et al., 2015). Punikalagin je bioaktivna komponenta koja je odgovorna preko 50% za antioksidativnu aktivnost. Ispitivanjem hemijskih jedinjenja iz kore ukazano je da fenetil ester kafeinske kiseline ima antikancerogeni efekat i primena ovog jedinjenja je korisna kao pomoćna terapija u lečenju karcinoma (Afaq et al., 2005; Turrini et al., 2015). Daljim ispitivanjem hemijskih jedinjenja iz kore ukazano je da fenetil ester kafeinske kiseline ima antikancerogeni efekat i primena ovog jedinjenja je korisna kao pomoćna terapija u lečenju karcinoma (Afaq et al., 2005; Turrini et al., 2015).



Slika 15. Detekcija koncentracija punikalagina (mg/L soka) u soku od semena i celog ploda nara od 14 različitih vrsta tokom 2014 i 2015. godine (Turrini et al., 2015)

2.2.4. Antimikrobni potencijal kore nara i njenog ekstrakta

Visoka koncentracija hidrosolubilnih tanina sa prevalencijom monomernih fenola u mezokarpu i u kori nara nalazi se u osnovi njihove antimikrobne aktivnosti. Prilikom pripreme ekstrakata veoma je važan izbor načina ekstrakcije i rastvarača koji se koriste, jer su to faktori od kojih zavisi koncentracija bioaktivnih jedinjenja, koji dalje definišu antioksidativnu i antimikrobnu moć (Li et al., 2015). Antimikrobna aktivnost PPE ispoljena je prema širokom spektru patogenih mikroorganizama. Značajan inhibitorni efekat dokazan je prema velikom broju patogenih G (+) i G (-) bakterija koje su česti kontaminanti različite vrste hrane i uzročnici mnogih epidemija širom sveta: *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* i *Brucella* spp. (Hayrapetyan et al., 2012). Ispitivana je i upotreba vodenog PPE u proizvodima u cilju kontrole rasta kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Rhodotorula glutinis* kako bi se smanjio njihov negativan uticaj na teksturu (Chen et al., 2020). Antifugalnu aktivnost PPE je pokazao inhibitornim efektom prema patogenom kvascu *Candida albicans* kao i značajnom redukcijom patogenih gljiva *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* i *Penicillium expansum* (Li Destri Nicosia et al., 2016; Ismail et al., 2019).

Iskazani bakteristatički i baktericidni efekat prema patogenim bakterijama može biti primenjen u konzervisanju hrane ili za preventivno tretiranje, iako mehanizam delovanja nije u potpunosti objašnjen. Optimizovana forma PPE može da se dodaje u kombinaciji sa hemijskim jedinjenjima za konzervisanje hrane čime se potencijal delovanja povećava. Detektovan je čak i pozitivan uticaj PPE kao prirodnog antimikrobnog sredstva u prevenciji bolesti paradajza izazvanom fitopatogenom bakterijom *Pseudomonas syringae* (Quattrucci et al., 2013).

U dosadašnjim istraživanjima antivirusnog efekta matičnog soka, ekstrakta i polifenola iz nara dobijeni su značajni rezultati, pogotovo prema surogatima HuNoV. Testiranjem polifenola iz ekstrakta ploda nara dobijena je značajna redukcija FCV, dok poređenjem polifenola, ekstrakta i matičnog soka nara nije dobijena značajna razlika u redukciji FCV, MNV i MS2 (Howel, 2013, Su et al., 2010). Značaj ovih rezultata treba sagledati u svetlu njihove potencijalne primene za tretman infekcije norovirusa. Poređenjem matičnog soka od brusnice, nara, grejpa i pomorandže, najbolji redukcionni potencijal ostvario je sok od brusnice i nara, i to redukujući sposobnost specifičnog vezivanja HuNoV (Su et al., 2010). Međutim, mehanizam delovanja ekstrakta i matičnog soka još uvek nije razjašnjen, smatra se da dolazi do interakcije polifenola i kapsida virusa što uzrokuje njegovo oštećenje. Mešavina soka od nara i brusnice ima isti efekat kao čist matični sok od brusnice (Li et al., 2012).

Antivirusni efekat PJ na surogate HuNoV testiran je pri različitim pH vrednostima (pH 3,4, 5, 6 i 7) i dobijeni rezultati redukcije surogata pokazali su da različita pH vrednost ne utiče na njegov antivirusni potencijal (Su et al., 2011). Oralno konzumiranje PJ doprinosi prevenciji i jačanju imuniteta protiv poxvirusa i HIV, dok je perzistentnost poliovirusa u toku 24h (u uslovima skladištenja, 4°C) bila samo 1%. U zemljama gde su se ranije pojavljivale epidemije prouzrokovane Zika virusom, H5N1 influenza i Ebola virusom, korišćen je 100% prirodni sok od nara za prevenciju i jačanje imuniteta (Kotwal, 2018).

Najnovije studije pokazale su da polifenolna jedinjenja (punikalagin, punikalin, galna i elagna kiselina) izolovana iz PPE imaju potencijal da inhibiraju i redukuju aktivnost proteina Covid-19 virusa, što može biti značajan korak u prevenciji i tretiranju infekcije (Singh et al., 2020; Suručić et al., 2020). Punikalagin u kombinaciji sa cink monohidratom ispoljio je značajnu inhibitornu aktivnost prema virusu Covid-19 (Jang et al., 2020). Takođe, druga jedinjenja kao što su pedunculagin, terkatain sa punikalinom imaju efekat na mesto vezivanja receptora (Cys145 i His41), inhibirajući enzim proteaze 2019-nCoV (Khalifa et al., 2020). U ranijim istraživanjima antivirusnog potencijala punikalagin je pokazao redukcionu sposobnost prema širokom spektru virusa: humani citomegalovirus, hepatitis C virus, denga, rubeoli i respiratorni sinicijski virus (Lin et al., 2013). Testiranje punikalagina u *in vivo* i *in vitro* uslovima na enterovirus 71, dovelo je do predloga za njegovo korišćenje kao antivirusnog sredstva protiv enterovirusa (Yang et al., 2013). Hidrosolubilni tanini, uključujući punikalagin, punikalin i geranin ispoljili su antivirusnu aktivnost prema B virusu (Liu et al., 2016).

Galna kiselina izolovana iz ploda nara pokazala je antiksidativnu, antibakterijsku, antivirusnu, antikancerogenu aktivnost. Antivirusna aktivnost galne kiseline izražava se preko stepena redukcije za hepatitis C virus (*Flaviviridae*) (Govea-Salas et al., 2015), poliovirus, influenci (*Orthomyxoviridae*) i stomatitis virus (*Rhabdoviridae*) (Liu et al., 2011). Elagna kiselina pokazala je inhibitornu aktivnost prema patogenima bakterijama kao što su *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. i *Sallmonela* spp. (Sepulveda et al., 2012), i redukcionu sposobnost za ebola virus (Cui et al., 2018).

2.2.5. Ispitivanje fizioloških aktivnosti ekstrakata kore ploda nara i moguća primena u prevenciji i lečenju bolesti

Ekstrakt kore ploda nara i sok su bogati polifenolima koji se ponašaju kao prebiotici i podstiču rast probiotskih bakterija *Bifidobacterium breve* i *Bifidobacterium infantis*. Zbog navedene aktivnosti ekstrakti predstavljaju obećavajući dodatak hrani u cilju održavanja normalne funkcije organizma. Takođe, prilikom primene PPE u okviru oralne higijene usne duplje ostvaren je baktericidni efekat prema *Streptococcus mutans* i *Streptococcus salivarius*. U literaturi se navodi značaj PPE i mogućnost njegove primene u prevenciji mnogih bolesti kao što su različiti tipovi kancera, dijabetesa i drugih, i u lečenju kancera pluća (Li et al., 2016). Pored već navedenih efekata (antikancerogeni, antiinflamatorni, antioksidativni) neka ispitivanja pokazuju da PPE može da utiče i na smanjenje lipida u krvi (Li et al., 2006; Hossin, 2009; Lin et al., 2013; Bassiri-Jahromi, 2018). Generalno, kada se govori o lekovitim biljnim ekstraktima mora se voditi računa da se konzumiraju u preporučenim vrednostima, da ne bi došlo do ispoljavanja neželjenog toksičnog efekta. Odabrane visoke koncentracije PPE testirane su na miševu *in vivo*. Testiranje je vršeno rastvaranjem PPE u destilovanu vodu koju su miševi konzumirali oralno. Nakon tri nedelje praćenja nije dobijen toksičan efekat (Bassiri Jahromi et al., 2015). Studija koju su sprovedi Heber et al. (2007) nakon laboratorijskih analiza (uključujući kompletnu krvnu sliku, hemiju i proveru urina) je pokazala da konzumiranje PPE u kapsulama u dozi od 1420 mg dnevno tokom četiri nedelje je bezbedno za čoveka. U okviru navedene studije vršena je procena antioksidativnosti kod osoba sa prekomernom težinom konzumirajući ekstrakt polifenola koji je obogaćen elagitaninom nara u dozi od 1000 mg. Rezultati su ukazali na antioksidativnu aktivnost kroz značajno smanjenje tiobarbiturne kiseline koja je povezana sa rizikom od kardiovaskularnih bolesti. Nije bilo neželjenih efekata pri konzumiranju kod ispitivani subjekta na različitim lokacijama (Heber et al., 2007). Konzumacija ekstrakta i soka ploda nara je povezna sa mnogim zdravstvenim benefitima koje su opisane u

različitim stidijama. Naučni dokazi ukazuju na potencijal primena nara i njegovih proizvoda u cilju poboljšanja zdravlja ljudi. Različite studije ukazuju na mogućnost primene u prevenciji mnogih bolesti, međutim to zahteva dodatna istraživanja koja obuhvataju širu populaciju, duži vremenski period, placebo efekat i standardizovati dozu (Giménez-Bastida, Ávila-Gálvez et al., 2021).

2.3. Antimikrobni potencijal ekstrakta lekovitih biljaka

Biljni ekstrakti su se od davnina koristili zbog svog ukusa, kao začini, ali i u tradicionalnoj medicini. Savremeni trend su prirodna antimikrobna sredstva koja se koriste u medicini, konzervisanju hrane i kao baktericidno sredstvo za dezinfekciju. Delovi lekovitih biljaka (cvet, list, i plod) su ispitivani prema širokom spektru mikroorganizma. Delovi lekovitih biljaka se prerađuju u prehrambenoj industriji u sokove, sirupe, džemove, ekstrakte ili najjednostavnije u čajeve. Biološka aktivnost određena je mnogobrojnim hemijskim jedinjenjima koja su najčešće prisutna u visokoj koncentraciji u biljkama i njihovim proizvodima koji imaju boju (aronija, brusnica, nar, borovnica i druge).

Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott, *Rosaceae* (aronija) je bogata polifenolima zbog čega je intenzivno proučavana zbog medicinskog potencijala. Testiranjem aronije i njenih jedinjenja, utvrđen je značajan antivirusni efekat prema influenci (Park et al., 2013). Novije istraživanje ukazalo je na mogućnost redukcije SARS-CoV-2 i virusa influence sa matičnim sokom aronije, nara, ali i sa ekstraktom zelenog čaja (Frank et al., 2020).

Sideritis spp., *Lamiaceae* je u narodu poznat kao planinski čaj, ali se koristi i kao etarsko ulje. Ispitivanjem etarskog ulja *Sideritis* spp. (do 0.1%) i ekstrakta pokazana je značajna antibakterijska i antifungalna aktivnost prema *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i dva soja kvasca *Candida albicans* (Tadić et al., 2017; Yiğit Hanoğlu et al., 2016; Basile et al., 2006).

Antimikrobna aktivnost ekstrakta crvenog i belog vina tesirana je na *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*. Antimikrobna aktivnost je povezana sa ukupnim sadržajem fenola u ekstraktima, pri čemu je dobijena veća rezistencija, odnosno manja redukcija *Candida albicans* u odnosu na patogene bakterije (Papadopoulou et al., 2005). Crveno i belo vino je testirano u različitim uslovima pri čemu je dobijena redukcija širokog spektra patogenih mikroorganizma *Salmonella* spp., *Shigela*, *Pseudomonas* i drugi (Friedman et al., 2006; Waite i Daeschel, 2007; Friedman, 2014).

Helichrysum plicatum DC., *Asteraceae*, odnosno smilje se odavnina koristi u tradicionalnoj medicini zbog antioksidativnog i antimikrobnog potencijala. Rezultati ispitivanja sprovedenih sa *Helichrysum plicatum* ukazuju na snažan uticaj koncentracije polifenola koji je u korelaciji sa antimikrobnim efektom. Od testiranih bakterija najosetljivije su bile *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus hauseri*, a najrezistentnija bakterija je bila *Escherichia coli*. Takođe, ekstrakt *Helichrysum plicatum* imao je inhibitorski efekat na rast humanog patogenog kvasca *C. albicans* i na fitopatogenu gljivu *Aspergillus flavus* (Bigović, 2013; Vujić et al., 2020).

Kantarion (*Hypericum perforatum* L. *Hypericaceae*) je proučavan zbog svog hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti. Antivirusna aktivnost kantariona prvi put je testirana i dokazana u *in vitro* i *in vivo* uslovima na virus infektivnog bronhitisa (Chen et al., 2019). Ranija ispitivanja su ukazala da tretman sa *Hypericum perforatum* ima značajan inhibitorski efekat na influencu i HIV (Birt et al., 2009; Brondz and Brondz, 2012). Ekstrakt pripremljen od *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis., odnosno rtanjski čaj pokazao je širok spektar antimikrobnog delovanja: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* i drugih (Kremer et al., 2015). Neki biljni ekstrakti su korišćeni za ispitivanje antivirusnog potencijala na surogate HuNoV. Značajnost ispitivanja ekstrakta medicinskih biljaka ogleđa se u mogućnosti tretiranja i prevenciji bolesti prirodnim putem. Ekstrakt hibiskusa (*Hibiscus sabdariffa*) je pokazao značajnu antivirusnu aktivnost prema surogatima HuNoV (MNV i FCV) i HAV (Joshi et al., 2015). Različite koncentracije semena bibera (*Zanthoxylum armatum*) su testirane na surrogate HuNoV i najbolja redukcija postignuta je sa 10%

metanolnim rastvorom ekstrakta. Ekstrakt zelenog čaja (*Camellia sinensis*) je testiran na surogat HuNoV (MNV) i HAV u različitim koncentracijama pokazao je značajan antivirusni efekat. Pored toga, ekstrakt zelenog čaja (10 mg/mL) pokazao se kao efikasno prirodno dezinfekciono sredstvo na nerđajućem čeliku i staklu gde je dobijena potpuna redukcija. Takođe, testiran je u zelenoj salati i spanaću gde je dobijena redukcija od 1,5 log nakon 30 min (Randazzo et al., 2017).

2.4. Dezinfekcija i sanitacija površina koje dolaze u kontakt sa hranom

Sanitacija i dezinfekcija su među najznačajnijim procesima u proizvodnji hrane koji utiču direktno ili indirektno na zdravlje ljudi. Pravilno izvedena sanitacija ili dezinfekcija površina ima uticaj na prevenciju unakrsne kontaminacije, sprečavanju pojave epidemija ili pojedinačnih slučajeva infekcije patogenim mikroorganizmima (Djebbi-Simmons et al., 2020). Epidemije su često izazvane neadekvatnom sanitacijom i dezinfekcijom nakon individualnih slučajeva povraćanja ili dijareje. Jedan od razloga što neka dezinfekciona sredstva na bazi hlora nisu efikasna prema HuNoV je koncentracija koju preporučuju proizvođači ili zakonom regulisani standardi. Agencija za zaštitu životne sredine (EPA, Environmental Protection Agency) i Agencija za hranu i lekove (FDA, Food and Drug Administration) regulišu Pravilnik o korišćenju tečnih dezinfekcionih sredstava, dok EPA reguliše dezinfekciona sredstva koja se koriste za površine uključujući i sredstva kojima se dezinfikuju površine koje dolaze u kontakt sa hranom. Prema EPA efikasno dezinfekciono sredstvo prema virusima je sredstvo koje ima sposobnost inaktivacije 4 log₁₀ izvan citotoksične efikasnosti (EPA, 2016a and 2016). Dezinfekciona sredstva koja su registovana kao efikasna prema HuNoV su na bazi aktivne komponente natrijum-hipohlorita, vodonik-peroksida, limunske kiseline. Utvrđeno je da HuNoV pokazuje rezistenciju prema nekim sredstvima koja uspešno inaktiviraju surogate. Sredstva za koja je potvrđena efikasnost prema HuNoV su na bazi hlora (Yeargin et al., 2015). Najčešća komercijalno dostupna sredstva su na bazi hipohlorita, kao što je natrijum-hipohlorit. Preporuka je da se koriste koncentracije slobodnog hlora od 1000 ppm (za čiste površine) odnosno 5000 ppm (za prljave) (EPA, 2019; Yan et al., 2020). Definisana koncentracija jedinjenja na bazi hlora koja se koriste za površine koje dolaze u kontakt sa hranom iznosi 200 ppm, ukoliko se koriste veće koncentracije moraju biti isprane sa većom količinom vode. Efikasnost dezinficijenas na bazi hlora zavisi od koncentracije, i ukoliko je niska, neće u potpunosti inaktivirati mikroorganizme. Uobičajena koncentracija ovih jedinjenja oštećuje i degradira većinu površina i njihova primena je opasna u slabo provetrenim prostorijama (Rutala i Weber, 2016).

Nedavno je Agencija za istraživanje i kvalitet zdravstvene zaštite, prilikom monitoringa čišćenja, dezinfekcije ili sanitacije, uvela primenu fluorescentnih markera ili ATP testova umesto vizuelne inspekcije (Rutala i Weber, 2016). Brza metoda detekcije adenozin trifosfata (ATP) deo je HACCP programa u pogonima prehrambene industrije. Značaj ove metode je u brzjoj proveru ispravnosti postupka sanitacije ili dezinfekcije. Metod se zasniva na detekciji molekula ATP koji je prisutan u svim živim ćelijama, uključujući i ostatke hrane.

Primena vlažnih antimikrobnih maramice predstavlja jednu od tehnika za dekontaminaciju površina. Njihova uspešna primena uslovljena je aktivnom komponentom koju sadrže ili se natapa sa dezinfekcionim sredstvom (Becker et al., 2019). Vlažne maramice mehanički odklanjaju kontaminaciju sa površina. Bez obzira od materijala koji čini maramice (pamučne, mikrovlakna, nabazi celuloze) one su za jednokratnu upotrebu i odnosi se na fizičko uklanjanje tj. brisanje. Direktni kontakt ruku ili odeće sa kontaminiranim maramicama može da proširi kontaminaciju na druge površine (Rutala i Weber, 2016). Takođe, primena vlažnih maramica koje imaju slabiji potencijal dezinfekcije (regulisano aktivnom komponentom) može biti ne samo neefikasno, već i proširiti kontaminaciju na druge površine (Rutala i Weber, 2016).

Kontrola alergena postaje sve važniji aspekt bezbednosti hrane. Nakon sanitacije površina rezidue proteina često zaostanu, a i zbog svoje prirode teško se u potpunosti uklanjaju sa površina. Preporuka je da alergeni budu identifikovani kao opasnosti, pogotovo u segmentima prehrambene industrijama gde postoji verovatnoća da se nađu u hrani. Alergijska reakcija na proteine u malim koncentracijama za osetljive ljude može biti opasna po zdravlje (Center for Food Safety and

Applied Nutrition, 2021). Brzi ATP test nema dovoljnu senzitivnost za detekciju proteina na površinama. Relativno novi, brzi testovi počeli su da se koriste u prehrambenoj industriji i imaju potencijal da detektuju niske koncentracije proteina koje mogu da izazovu alergijsku reakciju. Savremeni FLASH® brzi vizuelni testovi su u sklopu HACCP sistema i koriste se za detekciju rezidua proteina na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom. Brzi rezultati su značajni jer se može sprečiti unakrsna kontaminacija i u relativno kratkom vremenu izvršiti ponovna sanitacija.

3. NAUČNI CILJ ISTRAŽIVANJA

Humani norovirusi se ubrajaju među najznačajnije patogene koji se prenose hranom u kojoj dobro preživljavaju ali se ne umnožavaju u njoj kao i kontaminiranim površinama koje dolaze u kontakt sa hranom. Neke od karakteristika humanih norovirusa, kao što je na primer rezistentnost na mnoga dezinfekciona sredstva koja se uobičajeno koriste za dezinfekciju i sanitaciju u pogonima prehrambene industrije, predstavlja značajan problem. Sredstva na bazi hlora su efikasna za redukciju humanih norovirusa, međutim rezidue koji nastaju tokom njihove upotrebe predstavljaju rizik po zdravlje ljudi. Na osnovu navedenog uočena je potreba da se pronađu nova alternativna prirodna antinorovirusna sredstva. Specifični ciljevi doktorske disertacije bili su:

1. Odabir biljnog ekstrakta. Testirano je 11 potencijalnih kandidata lekovitih biljnih vrsta za redukciju HuNoV u *in vitro* uslovima. Biljni ekstrakti su testirani u različitim koncentracijama na 37°C. Cilj je bio optimizacija metode izolacije virusne nukleinske kiseline nakon delovanja ekstrakta i odabir najpogodnije koncentracije za dalje eksperimente. Na osnovu dobijene redukcije broja čestica virusa ispitivanih ekstrakta i njihove minimalne inhibitorne aktivnosti na detekciju odabran je ekstrakt kore nara;
2. Hemijska karakterizacija ekstrakta kore nara. Cilj je bio utvrditi koncentraciju bioaktivnih komponenti ekstrakta. Takođe, hemijska karakterizacija je izvršena za komercijalno dostupan matični sok od nara, deklarisan kao 100% dobijen od ploda nara. Naučni cilj karakterizacije je upoređivanje koncentracija prisutnih bioaktivnih jedinjenja i njihove antivirusne aktivnosti;
3. Testiranje odabranog ekstrakta kore nara u različitim koncentracijama za redukciju HuNoV u suspenziji (PBS) na temperaturama 25°C i 37°C;
4. Ispitivanje antivirusnog efekta ekstrakta kore nara u simuliranim gastričnim i intestinalnim uslovima;
5. Ispitivanje antivirusnog efekta ekstrakta kore nara na različitim modelima hrane (navesti u zagradi koji su modeli hrane). Izabrano je mleko koje ima složen matriks, i matični sok nara radi poređenja sa efektima postignutih dejstvom ekstrakta kore nara;
6. Testiranje potencijala ekstrakta kore nara za redukciju broja čestica virusa, na površinama od materijala koji najčešće dolaze u kontakt sa hranom (nerđajući čelik i plastika). Cilj je bio da se PPE kao prirodni antivirusni agens, koristi za dezinfekciju površina koje se koriste za pripremu hrane;
7. Testiranje efikasnosti ekstrakta kore nara za redukciju humanih norovirusa na biološkim površinama svežeg povrća (čeri paradajz i mladi luk). Cilj je bio da se ispita potencijalna primena PPE, kao začina koji bi mogao redukovati virusne kontaminente na površini sveže hrane;
8. Primena transmisije elektronske mikroskopije za analizu čestica humanog norovirusa u suspenziji i posle tretmana sa ekstraktom kore nara. Cilj je bio da se primenom ove metode potvrdi antivirusni efekt PPE na redukciju HuNoV;
9. Kvantifikacija čestica norovirusa nakon tretiranja sa komercijalnim dezinfekcionim sredstvima na bazi hlora. Naučni cilj je poređenje redukcionog potencijala dezinfekcionih sredstava na bazi hlora sa prirodnim PPE;
10. Primena brze metode detekcije ATP molekula za praćenje mešane bakterijske i virusne kontaminacije na površinama posle primene različitih metoda dezinfekcije. Naučni cilj je uporedno korišćenje metoda ATP detekciju za bakterija i RT-qPCR za detekciju virusa;
11. Mogućnost primene alergen indikator protein testa - FLASH metode za detekciju čestica norovirusa na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom.

4. MATERIJAL I METOD

4.1. Priprema suspenzije humanog norovirusa

Uzorci fecesa pacijenta sa simptomima akutnog gastroenteritisa obezbeđeni su u saradnji sa Univerzitetskom dečijom klinikom Tiršova, Beograd. Uzorci fecesa pacijenta obolelih od akutnog virusnog gastroenteritisa sakupljeni su tokom godinu dana u dečijoj klinici Tiršova, Beograd. Uzorci su dopremljeni na ledu do Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu i zamrznuti na -78°C do dalje upotrebe. Od uzoraka fecesa pripremljena je 10% suspenzija u sterilnom fosfatnom puferu (phosphate buffered saline, PBS, pH 7,2; AppliChem, Barselona, Španija). Prečišćena suspenzija dobijena je nakon centrifugiranja (Eppendorf centrifuga 5804 R, 14,000 G/20 min na 4°C) i filtrirana pomoću špic-filtera, veličine pora 0,45 μm i 0,22 μm (Thermo Fisher Scientific, Nemačka). Od 10% suspenzije pripremljena je 1% suspenzija koja se koristila za planirane eksperimente.

4.1.1. Identifikacija i kvantifikacija virusnih čestica

Kvantifikacija norovirusnih genomskih ekvivalenata/ μL određena je u 1% suspenziji metodom apsolutne kvantifikacije. Kvantifikacija genomskih ekvivalenata (GE) nepoznatog uzorka je u korelaciji sa standardom poznate koncentracije. Metod apsolutne kvantifikacije se sastoji u dizajniranju standardne krive specifične za humani norovirus GII. Pozitivna kontrola (PC) se koristila kao standard poznate koncentracije. Od decimalnog razblaženja PC pripremljena je standardna kriva. Uzorci 1% norovirusne suspenzije nepoznate koncentracije pripremljeni su odvojenim ependorficama. Pripremljeni uzorci PC i 1% stavljeni su u isti eksperimentalni test. Određivanje broja HuNoV GE/ μL u suspenziji izvršeno je primenom komercijalnog kita Quantification of Norovirus genotype 1 and 2, Primer Design™ Ltd (Genesis, Velika Britanija). Za pripremu standardne krive koristila su se decimalna razređenja pozitivne kontrole (100 μL standarda + 900 μL RNA/DNAse slobodne vode):

Tabela 2. Priprema standardne krive i koncentracije standarda

Standardna kriva	Broj kopija
Tuba 1	2×10^5 per μL
Tuba 2	2×10^4 per μL
Tuba 3	2×10^3 per μL
Tuba 4	2×10^2 per μL
Tuba 5	20 per μL
Tuba 6	2 per μL

Važan parametar koji definiše efikasnost standardne krive je koeficijent korelacije (R^2). Koeficijent korelacije meri koliko dobro podaci nepoznatog uzorka odgovaraju standardnoj krivi. Koeficijent R^2 prikazuje linearnost krive i idealno je da bude 1, ali je generalno maksimalna vrednost 0,999. Takođe, još jedan važan parametar koji određuje uspešnost, stvarnu sliku i pouzdanost reakcije je efikasnost reakcije (E). Efikasnost reakcije (100%) odgovara nagibu krive od -3,32 kako je određeno sledećom jednačinom:

$$\text{Efikasnost} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

U idealnom slučaju, E treba da bude 100 %. Dužina, sekundarna struktura, sadržaj guanina i citozina utiče na efikasnost reakcije. Ostali uslovi su dinamika same reakcije, upotreba neoptimalnog reagensa, koncentracije i kvalitet enzima što može rezultirati efikasnošću ispod 90%. Prisustvo inhibitora u jednom ili više reagenasa može uzrokovati efikasnost preko 110%. Reakcija se smatra dobrom ukoliko je postignuta efikasnost reakcije između 90% i 110%, što odgovara nagibu između -3,58 i -3,10. U mnogim istraživanjima validni rezultati su oni koji imaju vrednost veću od 90% i manju od 110%, a drugi rezultati se odbacuju.

4.2. Biljni materijal

4.2.1. Priprema i hemijska karakterizacija ekstrakata odabranih lekovitih biljaka

Ekstrakti biljaka: *Sideritis raeseri*; *Gentiana asclepiadea*; *Aronia melanocarpa*; *Gentiana lutea*; *Helichrysum plicatum*; *Hypericum perforatum*; *Aronia melanocarpa*; *Satureja subspicata*; *Mahonia aquifolia*; *Punica granatum*; *Vitis vinifera* var. *Prokupac*, pripremljeni su na Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr. Josif Pančić“, a testiranje antivirusnog potencijala urađeno je na Poljoprivrednom fakultetu, u Beograd.

Tabela 3. Odabrani ekstrakti lekovitih biljaka za testiranje antivirusne aktivnosti

Naziv ekstrakta	Tradicionalni naziv	Deo biljke	Skraćenica
<i>Sideritis raeseri</i>	Planinski čaj	herba	SRE
<i>Gentiana asclepiadea</i>	Plava lincura	koren	GAE
<i>Aronia melanocarpa</i>	Aronija	list	AMLE
<i>Gentiana lutea</i>	Žuta lincura	koren	GLE
<i>Helichrysum plicatum</i>	Smilje	cvasti smilja	HPE
<i>Hypericum perforatum</i>	Kantarion	biljka	HyPE
<i>Aronia melanocarpa</i>	Aronija	plod	AMFE
<i>Satureja subspicata</i>	Rtanjski čaj	biljka	SSE
<i>Mahonia aquifoli</i>	Mahonija	kora	MAE
<i>Punica granatum</i>	Nar	kora ploda	PPE
<i>Vitis vinifera</i> var. <i>Prokupac</i>	Vino		WPE

Biljni materijal je sušen na sobnoj tempertauri (*room temperature*, RT) i nakon toga je samleven u laboratorijskom mlinu. Ekstrakcija je vršena maceracijom uz korišćenje 70% EtOH. Ekstrakti su filtrirani i upareni do suva pod niskim pritiskom. Ekstrakt *Vitis vinifera* var. *Prokupac* je dobijen uparavanjem pod vakuumom (Büchi CH, Switzerland) do suva. Osušeni ekstrakti su čuvani u eksikatoru do daljih analiza. Ekstrakti lekovitih biljaka i njihovi delovi koji su korišćeni za ispitivanje antivirusne aktivnosti prikazani su u Tabeli 3. Rastvaranje LBE vršeno je primenom

mešavine dva rastvarača (30% etanol, EtOH i 5% dimetil-sulfoksidom, DMSO). Finalne koncentracije (0,2; 0,4, 1 i 2,5 mg/mL) napravljene su sa 5% DMSO.

4.2.2. Priprema i hemijska karakterizacija ekstrakta kore i matičnog soka ploda nara

Divlji plodovi nara sakupljeni su u selu Do (Bosna i Hercegovina). Kora je odvojena od ploda i sušena na RT, nakon toga je samlevena u laboratorijskom mlinu. Maceracija je izvršena sa 70% EtOH, a uparavanje (Büchi CH, Switzerland) pod niskim pritiskom na temperaturi < 50°C. Komercijalni sok od nara kupljen u lokalnoj prodavnici i deklarisan kao organski matični sok napravljen je od 100% ploda (pH 3,3; Nemačka). Priprema matičnog soka vršena je na sličan način kao priprema ploda, ali bez mlevenja i sušenja na RT.

4.2.2.1. Određivanje ukupnog sadržaja fenola

Ukupan sadržaj fenola je analiziran spektrofotometrijski korišćenjem blago modifikovane Folin Ciocalteu metode (Waterman i Mole, 1994). 200 µL rastvora ekstrakta (1:25) je pomešano sa 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa (1:10). Nakon 4 min, dodato je 800 µg natrijum karbonata (75 g/L). Uzorci su inkubirani 2h u mraku na sobnoj temperaturi. Absorbanca je izmerena na 765 nm na UV/VIS spektrofotometru prema metodi propisanoj u Evropskoj farmakopeji (HP 8453, Agilent Technologies, SAD). Kalibraciona kriva je pripremljena korišćenjem galne kiseline (GA), (0-100 mg/L). Analiza je urađena u triplikatu. Rezultati su izraženi kao miligrami galne kiseline po miligramu težine suvog ekstrakta (mg GAE/g DW) i miligrami galne kiselina na 100 mL soka (mg GAE/100 mL matičnog soka nara).

4.2.2.2. Određivanje ukupnog sadržaja tanina

Sadržaj taninskih materija određen je na osnovu Evropske farmakopeje 7.0. (European Pharmacopoeia, 2011) korišćenjem phosphomolybdotungstic reagensa. Absorbanca je merena na 760 nm korišćenjem UV/VIS spektrofotometra (HP 8453, Agilent Technologies, SAD). Ukupan sadržaj izražava se kao procenat pirogalola. Analiza je urađena u triplikatu.

4.2.2.3. Određivanje bioaktivnih komponenti ekstrakta kore (PPE) i matičnog soka ploda nara (PJ)

Određivanje sadržaja punikalagina, punikalina, galne i elagne kiseline u PPE vršeno je pomoću instrumenta Agilent 1200 RR HPLC (Agilent, Valdbron, Nemačka) koji je opremljen DAD detektorom, korišćenjem reverzne analitičke kolone Zorbax SB-C18 (Agilent), (veličina čestica 5 µm; 150 mm × 4,6 mm). Mobilna faza A bila je rastvor ortofosforne kiseline u vodi (1% v/v), a mobilna faza B acetonitril. Zapremina uzorka od 5 µL, sa brzinom protoka od 1 mL/min. Temperatura kolone održavana je na 25°C. Gradijentna elucija izvršena je prema sledećoj šemi: 98-90% A (0-5 min); 90% A (5-15 min); 90-85% A (15-20 min); 85-70% A (20-25 min); 70-40% A (25-30 min); 40-0% A (30-34 min). Detekcija komponenata vršena je na 260 i 320 nm. Rezultati su računati na osnovu kalibracionih kriva standarda (punikalagin, punikalin, galna i elagna kiselina). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja u mg/g suvog ekstrakta. Galna i elagna kiselina koristile predstavljaju standarde i kao čiste komponente testirane su na antinorovirusnu aktivnost koncentraciji 5 mg/mL rastvorene u 5 % DMSO.

4.3. Metode ispitivanja antivirnog efekta ekstrakta ploda nara i poređenje sa komercijalnim dezinfekcionim sredstvima

4.3.1. Tretman norovirusa lekovitim biljnim ekstraktima (LBE) u *in vitro* uslovima

Biljni materijal je sušen na sobnoj temperaturi (*room temperature*, RT) i nakon toga je samleven u laboratorijskom mlinu. Ekstrakcija je vršena maceracijom uz korišćenje 70% EtOH. Ekstrakti su filtrirani i upareni pod niskim pritiskom. Ekstrakt *Vitis vinifera* var. Prokupac je dobijen uparavanjem pod vakuumom (Büchi CH, Switzerland) do sušenja. Osušeni ekstrakti su čuvani u digestoru do daljih analiza. Ekstrakti lekovitih biljka i njihovi delovi koji su korišćeni za ispitivanje antivirusne aktivnosti prikazani su u Tabeli 3.

Rastvaranje LBE vršeno je primenom mešavine dva rastvarača (30% etanol, EtOH i 5% dimetil-sulfoksidom, DMSO). Finalne koncentracije (0,2; 0,4, 1 i 2,5 mg/mL) napravljene su sa 5% DMSO. Testiranje antivirusne aktivnosti LBE na HuNoV izvršeno je na 25°C i 37°C sa kontaktnim vremenom od 1h. Antivirusna aktivnost LBE i inhibitorni uticaj aktivnih komponenti na lančanu reakciju polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija (RT-qPCR) su glavni faktori odabira ekstrakta kore ploda nara za dalji tok eksperimenata.

4.3.2. Tretman humanih norovirusa (HuNoV) sa ekstraktom kore nara (PPE) u *in vitro* uslovima

4.3.2.1. Testiranje različitih koncentracija PPE

Testiranje antivirusnog efekta ekstrakta kore nara (PPE) vršeno je sa finalnim koncentracijama od 2 mg/mL i 5 mg/mL u jednakoj zapremini sa HuNoV. Suvi ekstrakt PPE je odmeren na analitičkoj vagi i napravljen je štok od 10 mg/mL sa mešavinom rastvarača 5% i 30% EtOH nakon čega su uzorci razblaženi do finalnih koncentracija sa 5% DMSO. Inkubacija uzoraka vršena je na 25°C i 37°C. Odabrana eksperimentalna temperatura od 25°C predstavlja simulaciju ambijentalne temperature koja je uobičajna za prostorije u kojima borave ljudi dok je druga temperatura (37°C) približna temperaturi organizma. U eksperimente su uključene različite kontrole: HuNoV u PBS na odabranim temperaturama, HuNoV pomešan sa rastvaračima za pripremu rastvora ekstrakta (mešavina 30% EtOH + 5% DMSO i 5% DMSO) koje su uključene u cilju potvrde odsustva uticaja rastvarača na antivirusnu aktivnosti, odnosno da bi se izbegli lažno pozitivni ili negativni rezultati. Suspenzija HuNoV (10^5 GE/ μ L) je pomešana sa galnom i elagnom kiselinom koje su izolovane iz PPE u koncentraciji 5 mg/mL u kontaktnom vremenu 1 h na 37°C.

4.3.2.2. Ekstrakcija norovirusne RNK

Izolacija HuNoV RNK iz suspenzije PBS i eksperimentalnih mešavina izvršena je sa kitom Ribo Virus (Sacace, Biotechnologies, Italija) prema upustu proizvođača:

Pre početka izolacije dodata je interna ekstrakciona kontrola koja je kratko vorteksirana. Prvi korak sastojao se od liziranja sa 600 μ L pufera (RAV1) koji je praćen inkubacijom (5 min/70°C). Nakon čega su uzorci prebačeni u centrifugu (Boaco Germany M-240R) i centrifugirani 1 min/11,000 G. Za vezivanje virusne RNK koristile su se silikonske kolone (NucleoSpin[®] RNA Virus Columns), nakon čega su uzorci su preneti i kratko centrifugirani. Prečišćavanje RNK je vršeno sa 600 μ L 96% EtOH. Nakon čega su uzorci centrifugirani 1 min/8,000 G.

Drugi deo izolacije RNK obhvatio je dodatno prečišćavanje sa puferima za pranje, kako bi se uklonili svi potencijalni kontaminanti i inhibitori PCR reakcije prema sledećem protokolu:

- 500 μ L pufera za pranje (RAW), vortex
- Centrifugiranje 1 min/8,000 G
- 600 μ L pufera za pranje (RAV3), vortex
- Centrifugiranje 1 min na 8,000 G.
- 200 μ L RAV3 se dodaje kako bi se koristi da uklonili ostatci etanola i drugih reagenasa

Centrifugiranje 2 min/11,000 G. Izolovana virusna RNK je eluirana u 50 μ L RNase slobodne H₂O i inkubirana na 70°C/ 2 min i kratko centrifugirana 11,000 G. Nakon završenog postupka ekstrakcije, izolovana norovirusna RNK je dodatno prečišćena sa kitom OneStep[™] Inhibitor Removal (Zymo Research, SAD). Uzorci izolovane RNK su dodatno propušteni kroz kolone sa kratkotrajnim

centrifugiranjem. Kolone se sastoje od silikonskih membrana koje zadržavaju zaostale inhibitore PCR reakcije. Pri dodatnom prečišćavanju gubitci norovirusne RNK su zanemarljivi. Izolovana RNK je čuvana na -78°C do dalje analize.

4.3.3. Perzistentnost HuNoV u simuliranim gastrointestinalnim uslovima i modelu hrane

4.3.3.1. Rastvori i model hrane za testiranje perzistentnosti humanog norovirusa

- Fosfatni pufer (PBS, pH 7,2; AppliChem, Barselona, Španija);
- Simulirani gastrični fluid/suspencija (SGF, pH 1,2; Ricca Chemical Company, Ricca Chemical Company, Arlington, SAD). Hemijski sastav: voda, hlorovodonična kiselina, natrijum hlorid;
- Simulirani intestinalni fluid/suspencija (SIF, pH 7,5; USP XXII formulacija, Ricca Chemical Company, Ricca Chemical Company, Arlington, SAD). Hemijski sastav: voda, kalijum dihidrogen fosfat, natrijum hidroksid;
- Model hrane - mleko sa niskim sadržajem mlečne masti (0,5% m.m.) kupljeno u lokalnoj prodavnici, Srbija.
- Prirodni matični sok od nara napravljen od 100% ploda (PJ, pH 3,2, Nemačka).

4.3.3.2. Ispitivanje perzistentnosti HuNoV

Osnovna suspencija HuNoV (10^6 GE/ μ L) pomešana je sa različitim fluidima u odnosu 1:10. Fluidi u kojima je ispitana perzistentnost HuNoV su:

- Fosfatni pufer (PBS; pH 7,2);
- Simulirani gastrični fluid (SGF; pH 1,2);
- Simulirani intestinalni fluid (SIF; pH 7,5);
- Model hrane - mleko sa niskim sadržajem mlečne masti (0,5% m.m.)
- Prirodni matični sok od nara napravljen od 100% ploda (PJ, pH 3,2).

Suspencija HuNoV i navedenih fluida inkubirana je 1 h, 2 h i 6 h na 37°C, osim SGF i SIF. Mešavine suspencija HuNoV sa SGF i SIF su inkubirane na 2 h i 6 h. Odabrana vremena predstavljaju simulaciju oralno konzumiranih hranljivih komponenti pri prolasku kroz gastrointestinalni trakt. Mleko kao model hrane predstavlja kompleksan fluid (proteina, masti i ugljenih hidrata) koji može da ima protektivni efekat prema HuNoV česticama. Prirodni matični sok od nara je odabran za poređenje antivirusnog efekta sa PPE.

4.3.3.3. Testiranje antivirusne aktivnosti PPE

Nakon ispitivanja perzistentnosti HuNoV u odabranim fluidima dodat je PPE (5 mg/mL). Finalna koncentracija HuNoV u eksperimentalnim mešavinama je $5 \log_{10}$ GE/ μ L. Antivirusni efekat PPE je testiran u PBS i mleku, dobijeni rezultati su se poredili sa antivirusnim potencijalom PJ nakon 1 h, 2 h i 6 h na 37°C. U cilju ispitivanja antivirusnog potencijala, PPE je dodat u mešavinu SGF i SIF sa HuNoV. Takođe, testiran je uticaj niske pH i hemijskog sastava fluida na aktivne komponente ekstrakta tokom 2 h i 6 h na 37°C.

Procenat rezidualnog norovirusnog genoma je kvantifikovan poređenjem broja kopija u tretiranom uzorku sa netretiranom kontrolom prema formuli (Kamimoto et al., 2014), koristeći RT-qPCR vrednosti:

$$\text{Rezidualni norovirusni genom (\%)} = \frac{\text{Broj kopija nakon tretmana}}{\text{Broj kopija netretirane kontrole (PBS)}} \times 100$$

4.3.3.4. Ekstrakcija norovirusne RNK

Izolacija norovirusne RNK je vršena prema konzistenciji i hemijskom sastavu fluida. Primena različitih metoda vršena je kako bi se izbegli gubici RNK tokom procesa ekstrakcije i dobili rezultati koji su ponovljivi. U sve uzorke pre početka izolacije dodata je ekstrakciona kontrola. Ekstrakcija norovirusne RNK iz PBS, SGF, SIF i PJ vršena je pomoću kita Ribo-Sorb.

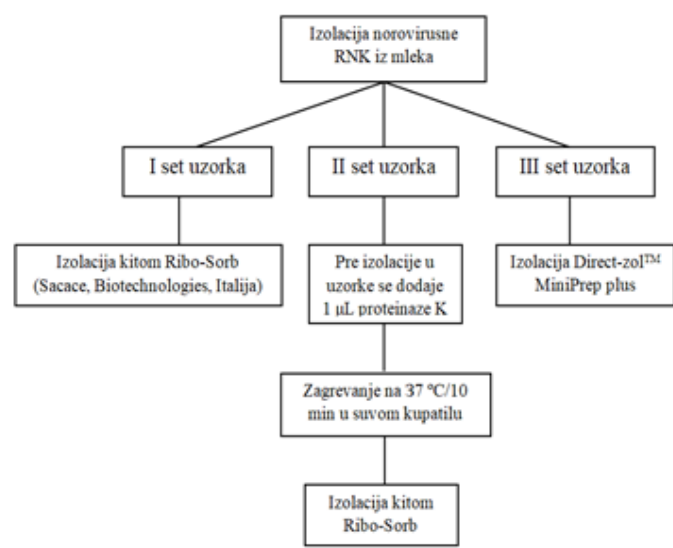
Postupak izolacije:

- Odmereno je 450 μ L pufera za razaranje virusnih partikula (*lysis buffer*), nakon toga je dodato 100 μ L interne kontrole, vorteksirani nekoliko sekundi i inkubacija 5 min;
- Mešavina je centrifugirana 1200 G/1 min;
- U mešavinu je dodato 25 μ L sorbenta koji ima ulogu vezivanja RNK. Princip sorbenta je sličan silikonskoj membrani. Centrifugiranje 1000 G/1 min je vršeno kako bi se talog pod uticajem centrifugalne sile zalepio za zid ependorfice;
- Odklanjanje nečistoća vršeno je sa 400 μ L rastvora za ispiranje (*washing solution*), uz vorteks. U ovom koraku, vršilo se duže vorteksovanje kako bi se sa taloga odklonila sva nečistoća iz uzorka koja može da ometa proces amplifikacije;
- Centrifugiranje 1000 G/1min i odbacivanje tečnog dela „supernatanta“;
- Dalje prečišćavanje je vršeno sa 500 μ L hladnog 70% EtOH u dva ponavljanja. Nakon svakog koraka prečišćavanja odbačen je supernatant;
- Završno prečišćavanje je vršeno sa 400 μ L acetona, uz vorteks. Centrifugiranje 1000 G/1min. Supernatant je odbačen;
- Inkubacija 10 min/60°C sa otvorenim čepovima;
- Izolovana RNK je resuspendovana u RNA-eluentu, 10 min /60°C uz periodičano vorteksovanje. Centrifugiranje 2 min / 14000 G;
- Izolovana RNK je zamrznuta na -78°C do upotrebe



Slika 16. Izolacija norovirusne RNK i RT-qPCR

Kompleksnost mleka kao matriksa utiče na izolaciju norovirusne RNK. Kvantifikacija HuNoV pre i nakon dodavanja PPE vršena je primenom tri metode (Slika 17). Setovi uzorka su identično pripremljeni. Za I set uzorka mleka koristio se kit Ribo-Sorb. Za II set uzorka, vršen je predtretman koji se sastojao od dodatka 1 μ L proteinaze K uz zagrevanje 10 min na 37°C (Hennechart-Collette et. al., 2017). Nakon predtretmana vršena je izolacija sa kitom Ribo-Sorb. Izolacija norovirusne RNK iz III seta izvršena je uz pomoć kita Direct-zol™ MiniPrep plus. Izvođenje izolacije III seta uzorka vršeno je u kombinaciji sa Trizol™ reagenasom i *spin* kolonom. Prečišćavanje je vršeno pomoću pufera za pranje. Izolovana RNK je čuvana u elucionom puferu na -78°C do dalje analize.



Slika 17. Tri metode izolacije norovirusne RNK iz matriksa mleka

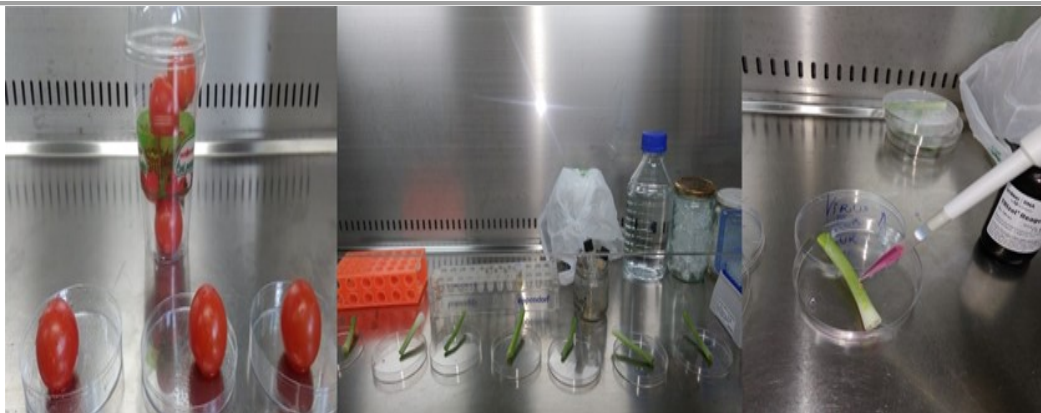
4.3.4. Redukcija HuNoV ekstraktom kore nara na svežem povrću

Čeri paradajz i mladi luk su odabrani kao reprezentativno sveže povrće koje se koristi bez termičke obrade u obliku salate, *ready to eat* hrane, sastojak švedskog stola i druge vrste hrane. Kupljeni su na lokalnoj zelenoj pijaci, dobro oprani i završno isprani sa miliQ vodom. Sveže povrće je stavljeno u sterilne petri šolje i njihove površine su sterilisane u laminarnoj komori pod dejstvom UV svetlosti 20 min.

Sterilne površine veštački su kontaminirane suspenzijom HuNoV (100 µL) i tretirane sa PPE (mg/mL) u sterilnim uslovima sa kontaktnim vremenom 1 h na 25°C, prema sledećem planu:

- Sterilne površine povrća veštački su kontaminirane suspenzijom HuNoV (5 log₁₀ GE/µL)
 - Metod I: suspenzija HuNoV (5 log₁₀ GE/µL) je naneta na površine svežeg povrća, nakon sušenja (15 min), dodat je je PPE (5 mg/mL);
 - Metod II: Sterilne površine su tretirane sa PPE (5 mg/mL) i ostavljene da se osuše 15 min, nakon toga je naneta suspenzija HuNoV(5 log₁₀ GE/µL).
- Na sterilne površine čeri paradajza i mladog luka naneta je miliQ voda (negativna kontrola)

Koncept metode brisa sa površina svežeg voća nije odgovarao dizajniranom eksperimentu, pa se koristila metoda elucije. Ekstrakcija norovirusne RNK započeta je eluiranjem sa 1 mL Trizol™ reagensom sa površina svežeg povrća, zatim su uzorci iz petri šolja sakupljeni i preneti u sterilne obeležene tubice. U pripremljenim tubicama je predhodno dodata interna ekstrakciona kontrola. Dalji tok izolacije vršen je prema navedenom protokolu (Radin i D'Souza, 2011a).



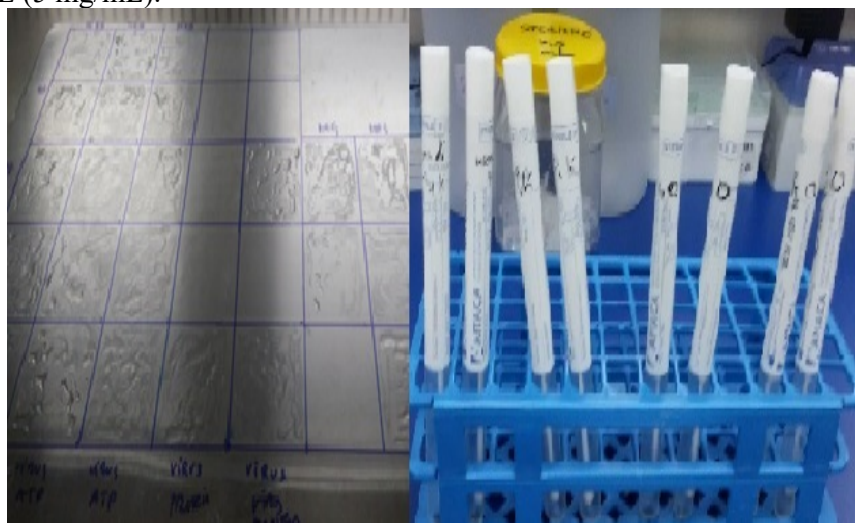
Slika 18. Izolacija netretirane (kontrola) i tretirane norovirusne RNK sa bioloških površina nakon 1h na 25°C.

4.3.5. Testiranje antinorovirusnog potencijala ekstrakta kore nara na površinama

Za testiranje antinorovirusnog potencijala PPE na površinama koristili su se sterilni pamučni brisevi. Protokol uzimanja briseva sa površina koje se koriste za pripremu hrane vršene su prema standardnom protokolu ISO/TS 15216-1:2013 (Lowther et al., 2019).

a) Postavka eksperimenta:

Antivirusna aktivnost PPE je testirana na površinama koje se koriste za pripremu, odlaganje ili skladištenje hrane. Odabrane reprezentativne površine su nerđajući čelik i plastika. Izabrane površine su oprane sa deterdžentom bez hlora, isprane sa vodom i finalno sa destilovanom vodom. Oprane površine su uvijene u aluminijumsku foliju i sterilisane u autoklavu pod pritiskom (121°C/20 min). U sterilnim uslovima, sterilisane površine su obeležene (5 x 5 cm) i opet sterilisane u laminarnoj komori 20 min. Testiranje antivirusne aktivnosti PPE vršeno je na 25°C sa kontaktnim vremenom 1h. Tretman na površinama od nerđajućeg čelika i plastike obuhvatio je nanos suspenzije HuNoV koja je služila kao netretirana kontrola (5 log₁₀ GE/μL) i sterilni PBS (negativna kontrola). Zatim drugi deo obeleženih površina su kontaminirane sa HuNoV (5 log₁₀ GE/μL), nakon sušenja (15 min), nanet je PPE (5 mg/mL).



Slika 19. Uzimanje uzorka sa površine od nerđajućeg čelika

b) Ekstrakcija HuNoV RNK Trizol™ reagensom

Zbog specifičnosti eksperimenta koristio se blago modifikovani direktan metod izolacije Trizol™ reagensom (Thermo Scientific™, SAD) (Radin i D'Souza, 2011b). Reagens Trizol™ je monofazani obojeni rastvor na bazi fenola i gvanidin izotiocijanata.

Postupak ekstrakcije se izvodio u sterilnim uslovima i sastojao se od sledećih koraka:

- Prvo su brisevi sakupljeni rotirajućim cik-cak pokretima. Zatim su stavljeni u 1 mL Trizol™ reagensu uz periodičan vorteks i inkubirani 5 min na RT. Brisevi nakon inkubacije su uklonjeni iz rastvora;
- U uzorke je dodato 200 µL hloroforma (ChemPur, Nemačka). Uzorci su vorteksovani 1 min i inkubirani 3 min na RT. Centrifugiranje 12,000 G 15 min/4°C, prema potrebi je produženo dok se jasno ne obrazuje granica između, vodene i organske (obojene) faze. U vodenoj fazi nalazi se ekstrahovana RNK koja se pažljivo odvajava i dalje prečišćava. U organskoj fazi se zadržavaju proteini i druge nepoželjne komponente. Organska faza se otklanja kao supernatant;
- U vodenu fazu je dodato 500 µL izopropanola. Nakon kratkog vorteksa Vortex i inkubacije 10 min na RT vršeno je centrifugiranje 10,000 G 10 min/4°C;
- Izdvojeni vodeni deo, odnosno supernatant se odbacio. Na dnu ependorfice se formirao beli talog koji se ispirao sa 1 mL hladnog 70% EtOH. Nakon toga su utorci postavljeni na centrifugiranje 7,500 G 10 min/4°C;
- Ependorfice su položene naopačke kako bi se talog osušio i zaostao EtOH ispario (7 min);
- Resuspendovanje taloga vršeno je u 40 µL RNA. Uzorci su inkubirani na 55°C/5 min, uz periodičan vorteks;
- Izolovana RNK čuvana je u prečišćenoj DNA/RNA-za slobodnoj vodi na -78°C, do upotrebe.

4.3.6. Testiranje komercijalnih dezinfekcionih sredstava za redukciju HuNoV

4.3.6.1. Komercijalna dezinfekciona sredstva

- Dezinfekciono sredstvo na bazi hlora (D1, aktivna komponenta: 4,5 g hlora oslobođenog iz natrijum hipohlorita, <5% izbeljivači na bazi hlora (natrijum hipohlorit), nejonski surfaktanti, sapun, miris); Dezinfekciono sredstvo D1 testirano je koncentrovano i razblaženo sa miliQ vodom do 250 ppm.
- Dezinfekciono sredstvo bez slobodnog hlora (D2, aktivna supstanca: dimetilbenzil amonijum hlorid 0,75 g/100 g proizvoda; alkil (C12-16); < 5% nejonski surfaktanti; katijonski surfaktanti, miris). Deklarisano kao sredstvo bez slobodnog hlora i prema uputstvu proizvođača testirano je koncentrovano.
- Komercijalno dostupne antibakterijske maramice, (hemijski sastav: hlorheksidin diglukonat (chlorhexidine digluconate, 0,1%) i fenoksietanol (phenoxyethanol, C₈H₁₀O₂), predstavljaju organska jedinjenja koja imaju ulogu dezinfekcionog sredstva i antiseptika u kozmetičkim proizvodima). Testiranje antivirusnog potencijala vlažnih maramica koje se koriste svakodnevno za brzu dezinfekciju ruku ili površina. Kvantifikovanje virusa izvršeno je nakon brisanja površina vlažnim maramicama.

4.3.6.2. Brisevi za testiranje potencijala dezinfekcionih sredstava

- ICON brisevi (Biocontrol, Italija): Specijalni brisevi za uzimanje uzoraka i detekciju ATP molekula na površinama; Specijalni brisevi za detekciju ATP molekula u tečnim materijalima;
- FLASH proteinski brisevi za detekciju rezidua proteina na površinama (Biocontrol, Italija);

4.3.6.3. Površine za testiranje antivirusnog potencijala

- Reprezentativne kontaktne površine (nerđajući čelik i plastika). Odabrane površine predstavljaju materijal koji svakodnevno dolazi u kontakt sa hranom i predstavlja rizik unakrsne kontaminacije;
- Reprezentativne biološke površine (čeri paradajz i mladi luk). Odabrano je sveže povrće kupljeno u lokalnoj prodavnici.

Za testiranje redukcione moći dezinfekcionih sredstva u suspenziji, pomešane su odabrane zapremine navedenih dezinfekcionih sredstva i suspenzije humanih norovirusa. Mešavine su inkubirane su u trajanju od 5 i 60 min za D1 (250 ppm), 60 min za D1 koncentracije 25 ppm i 15 min za koncentrovana D1 i D2.

Površine koje dolaze u kontakt sa hranom mogu biti kontaminirane sa drugim patogenim mikroorganizmima. Prisustvo indikatora fekalne kontaminacije prikazuje generalnu higijenu ili potencijalnu kontaminaciju površina enteričnim virusima ili HuNoV.

Brza detekcija efikasnosti dezinfekcionih sredstava vršena je metodom detekcije ATP molekula. U tu svrhu je korišćena koliformna bakterija *Escherichia coli* (ATCC25922).

Odabrane reprezentativne površine (nerđajući čelik i plastika) oprane su sredstvom koje nije na bazi hlora ili kvaterarnog amonijuma, zatim su isprane sa običnom vodom i finalno sa destilovanom vodom. Uvijene su u aluminijumsku foliju i sterilisane u autoklavu pod pritiskom (20 min/121°C). Sterilne površine su prenete u laminarnu komoru, obeležene (5 x 5 cm) i dodatno sterilisane u laminarnoj komori pod UV svetlom u trajanju od 15 min.

4.3.6.4. Priprema suspenzije bakterije *Escherichia coli*

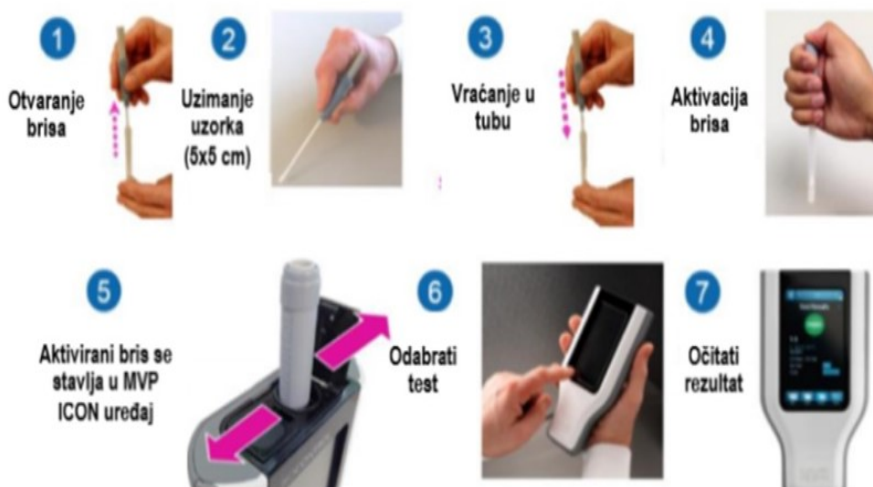
Escherichia coli (ATCC25922). Čista kultura pripremljena je iz štoka: 50 µL kulture je preneto u 5 mL sterilnog Miler Hilton bujona (Hi Media, Srbija) inkubacija je izvršena na 37°C/24 h. Broj bakterija određen je standardnom metodom McFarland (Biosan, Lativija). Pre korišćenja uređaja McFarlanda vršena je kalibracija standardima koji su označeni 0,5-10 koji su na bazi barijum-hlorida (BaCl₂) i sulfatne kiseline (H₂SO₄). U prekončnoj suspenziji *Escherichia coli* određen je broj ćelija koji po gustini odgovara McFarland standardu 0,5 i iznosi približno 10⁸ cfu/mL. Štok suspenzije bakterije je decimalno razblažen (1 mL suspenzije : 9 mL fiziološkog rastvora) do 10² cfu/mL. Različite koncentracije *E. coli* (10²-10⁷ cfu/mL), suspenzija HuNoV (u finalnoj koncentraciji 10⁵ i 10⁶ GE/µL) i mešavina virusa (u finalnoj koncentraciji 10⁶ GE/µL) i *E.coli* (10⁷ cfu/mL) pripremljene su u fiziološkom rastvoru. Pripremljene suspenzije su se koristile za testiranje efikasnosti dezinfekcionih sredstava. Suspenzija HuNoV (PBS) se detektuje kao pozitivna reakcija metodom detekcije slobodnog ATP-a, zbog čega je štok virusa na isti način pripremljen u fiziološkom rastvoru. Zapremina od 100 µL navedenih suspenzija je naneta na obeležene površine (25 cm²). Dezinfekcija površina kontaminiranih sa navedenim suspenzijama izvršena je sa D1, D2 i antibakterijskim maramicama na 25°C. Testirana su različita kontaktna vremena i koncentracije: 5 i 60 min za D1 (250 ppm), 25 ppm (60 min), 15 min za koncentrovana D1 i D2. Eksperiment je uključio i ispiranje površina nakon tretiranja (Tabela 3).

4.3.6.5. Tretman mešanih bakterijskih i virusnih kontaminata na površinama

Primenjene su dve metode detekcije: Metoda ATP bioluminiscencije (metoda praćenje prisustva norovirusa sa mešavinom koliformne bakterije *E.coli*) i RT-qPCR (praćenje prisustva i kvantifikacija norovirusa, ispitana je antivirusna efikasnost primenjenih tretmana, kao i efikasnost detekcije uređaja):

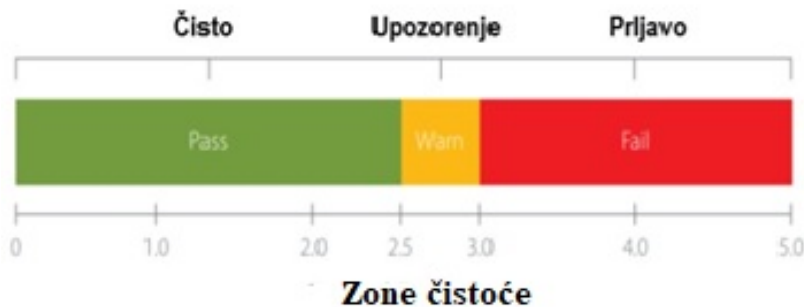
4.3.6.6. LIGHTNING ATP metoda

Lightning ATP metoda se zasniva na detekciji prisutnog ATP-a. Ova metoda se najčešće koristi kao kontrola higijene u sanitaciji prehrambenih pogona, koji ima HACCP verifikaciju. Rezultati uzetih briseva sa obeleženih i tretiranih površina očitavani su na aparatu MVP ICON® (Biocontrol, Italija). Aparat ima instaliran program za detekciju i upozoravanje da je površina kontaminirana organskim materijalom bilo kog porekla. Detekcija se vrši specijalnim brisevima koji se nakon aktivacije ubacuju u uređaj.



Slika 20. Postupak uzimanja brisa i očitavanje vrednosti ATP-a

- Negativna kontrola i čista površina trebaju da se očitaju u zoni 1,0-2,5, koja je označena zelenom bojom (Pass);
- Zona 2,6-3 upozorava na mogućnost prisutnosti nekih nečistoća, označava se žutom bojom (Warm);
- > 3 ukazuje prisutnost molekula ATP i takve površine se moraju podvrgnuti ponovnoj sanitaciji, crvena boja (Fail).



Slika 21. Zone očitavanja čistoće

4.3.6.7. RT-qPCR metoda

Brisevi su predhodno ovlaženi u fiziološkom rastvoru, nakon toga sa osušenih površina, cik-cak rotirajućim pokretima sakupljeni su uzorci sa površina. Za svaki uzorak napravljeno je 25 poteza kako bi uzorci bili sakupljeni na identičan način.

Tabela 5. Pregled tretmana površina različitim komercijalnim dezinfekcionim sredstvima

Uzorci	Koncentracija	Tretman			Metod	
		Hemikalije	Bez ispiranja	Ispiranje	RT-qPCR	Lightning ATP
Negativna kontrola*	-	/	-	-	+	+
<i>E.coli</i> ^b	10 ² , 10 ³ , 10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ , 10 ⁷	/	+	-	-	+
Suspenzija HuNoV ^a	10 ⁵ i 10 ⁶ GE/ μ L	/	+	+	+	+
HuNoV+ <i>E.coli</i> ^d 10 ⁶ +10 ⁷		D1 (250 ppm)	+	+	+	+
		D1 (conc)	+	+	+	+
		D2 (conc)	+	+	+	+
		PPE (5 mg/mL)	+		+	+
		Vlažne maramice ^e			+	+

- negativna kontrola – bris sa sterilne površine i površine na koju je nanet fiziološki rastvor;

a) suspenzija HuNoV u fiziološkom rastvoru (6 log GE/ μ L);

b) suspenzija *Escherichia coli* (10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ cfu/mL);

c) suspenzija HuNoV i D1 (250 ppm);

d) suspenzija HuNoV (koncentracija 6 log virusnih GE/ μ L) u kombinaciji sa suspenzijom *E.coli* (10⁷ cfu/mL) – mešavina se koristi za sve planirane tretmane;

e) mešavina suspenzije HuVoV i *E.coli*, brisanje površine komercijalnim antibakterijskim maramicama.

4.4. Detekcija kapsida norovirusa na površinama

HuNoV imaju proteinski kapsid koji je rezistentan na nisku pH, organske rastvorenje i može ostati virulentan u spoljašnjoj sredini duži vremenski period. FLASH[®] Allergen Indikator Protein test (BioControl Systems, SAD) je proteinski vizuelni test koji omogućava brzu detekciju proteinskih rezidua na površinama. Detekcija se manifestuje promenom boje tečnosti u kojoj se nalazi bris. Promena boje brisa ukazuje na prisustvo jedinjenja proteinskog porekla, čiji intenzitet zavisi od koncentracije proteina na površinama. Obeležene sterilne površine (10 x 10 cm) su kontaminirane sa 100 μ L suspenzijom HuNoV (10³-10⁶ GE/ μ L). Kontaminirane površine su ostavljene da se osuše na RT 15 min u sterilnim uslovima. Kolekcija briseva je sakupljena cik-cak rotirajućim pokretima. Negativna kontrola (fiziološki rastvor) naneta je na površine od nerđajućeg čelika i plastike kako bi se potvrdilo odsustvo proteina. Kolekcija sakupljenih briseva je inkubirana na dve temperature: 25°C i 70°C/10 min. Koncentracija rezidua proteina koja se može detektovati na ambijentalnoj temperaturi (25°C) je do 20 μ g. Senzitivnost testa se povećava na 70°C čime je moguće detektovati rezidue proteina od 3 μ g. Rezultati se očitavaju vizuelno. Brisevi se nalaze u tečnosti koja u dodiru sa proteinima menja boju, u rasponu od zelene do tamno ljubičaste (zeleno-čisto; sivo-zona upozorenja; svetlo do tamno ljubičaste-prisutnost proteina).



Slika 22. Postupak uzimanja i očitavanja FLASH® alergen protein testa

4.5. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze kojoj predhodi reverzna transkripcija (RT-qPCR)

4.5.1. Reagensi i kitovi za izolaciju RNK i RT-qPCR test

- Trizol™ reagens (Thermo Scientific™, SAD). Koristi se za izolaciju, kao lizirajuće sredstvo.
- Ostali reagensi koji su se koriste za izolaciju su navedeni u poglavlju Metode 4.2.;
- Kit Ribo Virus (Sacace, Biotechnologies, Italija);
- OneStep™ Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, SAD);
- Kit Ribo-Sorb (Sacace, Biotechnologies, Italija);
- Proteinaza K (Thermo Scientific™, SAD);
- Kit Diect-zol™ MiniPrep plus (Zymo Research, SAD).

Reagensi i uređaji za kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze kojoj predhodi reverzna transkripcija (RT-qPCR) prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Reakcione smeše, protokol reakcije i uređaji za detekciju i kvantifikaciju humanih norovirusa u različitim eksperimentima izvedenim u disertaciji.

Reagensi	Zapremina	Uređaj
Kit Quantification of Norovirus genotype 1 and 2, (Primer™ Ltd, genesing, UK)		
Oasing™ qRT-PCR MasterMix	10 µL	Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
Norovirus Primer/Probe mix	1 µL	
Interna ekstrakciona kontrola primer/probe mix	1 µL	
HuNoV RNK	8 µL	
Ukupna zapremina	20 µL	
Amplifikacioni uslovi (45 ciklusa)		
Početna faza	Reverzna transkripcija	50°C/12mn
	Denaturacija	94°C/12min
Faza ciklusa	Denaturacija	94°C/1 min
	Aniling	50°C/1 min

	Ekstenzija	61°C/1 min	
Kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, SAD)			
SuperScript III™ RT/Platinum® Taq Mix	0,4 µL		
2XSYBR Green reaction mix	10 µL		
Reverse primer* 10 µM, GII MON 431: 5' TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA 3'	0,4 µL		
Forward primer* 10 µM MON 433: 5' GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT 3'	0,4 µL		
*Primeri su dobijeni od Sigma-GenoSys (St. Louis, MO, SAD)			
ROX referentna boja (1:5)	0,5 µL	Applied Biosystems 7500 Fast Real- Time PCR System	
HuNoV RNK	8,3 µL		
Ukupna zapremina	20 µL		
Amplifikacioni uslovi (45 ciklusa)			
Početna faza	Reverzna transkripcija		50°C/12mn
Faza ciklusa	Denaturacija	94°C/12mn	
	Denaturacija	94°C/1 min	
	Aniling Ekstenzija	50 °C/1 min 61°C/1 min	
Kriva topljenja		77°C/00,09 95°C/00,15 50°C/01,00	
2x FastGene® IC Green One Step Mix			
2x Fast IC Green One	10 µL		
20x Scriptase	1 µL		
Forward primer*, MON 433: 5' GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT 3'			
Reverse primer*, 10 µM, GII MON 431: 5' TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA 3'	0,8 µL		
*Primeri su dobijeni od Sigma-GenoSys (St. Louis, MO, SAD)			
HuNoV RNK	8,2 µL	Applied Biosystems 7500 Fast Real- Time PCR System	
Ukupna zapremina	20 µL		
Amplifikacioni uslovi (45 ciklusa)			
Početna faza	Reverzna transkripcija	45°C/10 min	
Faza ciklusa	Denaturacija	95°C/2 min	
	Denaturacija	95°C/5 s	
	Aniling Ekstenzija	50°C /20 s 61°C/10 s	

Kriva topljenja		77°C/0,09 s	
		95°C/0,15 s	
		50°C/60 s	
Rotavirus/Norovirus/Astrovirus Real-TM kit (Sacace Biotechnologies, Italija)			
RT-PCR-mix-1	2 µL		
RT-PCR-mix-2	1 µL		
Polymerase	0,1 µL		
MMIv	0,05 µL		
RT-G-mix-2	0,05 µL		
Norovirusna RNK	1,8 µL		
Ukupna zapremina	5 µL		
Amplifikacioni uslovi (45 ciklusa)			
Početna faza	Reverzna transkripcija	30°C/12 min	
	Denaturacija	95°C/15 min	
Faza ciklusa	Denaturacija	95°C/10 s	
	Aniling	60°C/35 min	
	Ekstenzija	72°C/10 min	

Mic Real Time
PCR Cyler
(BioMolecular
Systems,
Australia)

Za kvantifikovanje i identifikaciju HuNoV u različitim uzorcima korišćena je molekularna metoda RT-qPCR. Real-time PCR ili PCR u realnom vremenu je metoda koja kombinuje standardnu amplifikaciju i fluorimetriju. Upotrebom fluorescentne boje (SYBR Green) ili fluorescentno obeleženih proba moguće je odrediti količinu PCR produkta u realnom vremenu, nakon svakog pojedinačnog ciklusa reakcije. S obzirom da je RT-PCR dizajniran za detekciju i kvantifikaciju DNK molekula jedna od novijih metoda omogućava detekciju i RNK molekula kao cDNK, metodom reverzne transkripcije. Reakcija reverzne transkripcije i lančana reakcija polimeraze odvijala se u jednom koraku u više ciklusa (One step RT-qPCR). Detekcija izolovane virusne RNK je izvršena korišćenjem specifičnih prajmera. Amplifikacija delova nukleinskih kiselina i detekcija signala umnoženog specifičnog produkta izvršena je na instrumentu Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems StepOne™, Thermo Scientific™, SAD), koristeći PCR ploče (*plate*) sa 48 bunarića (Applied Biosystems, SAD).

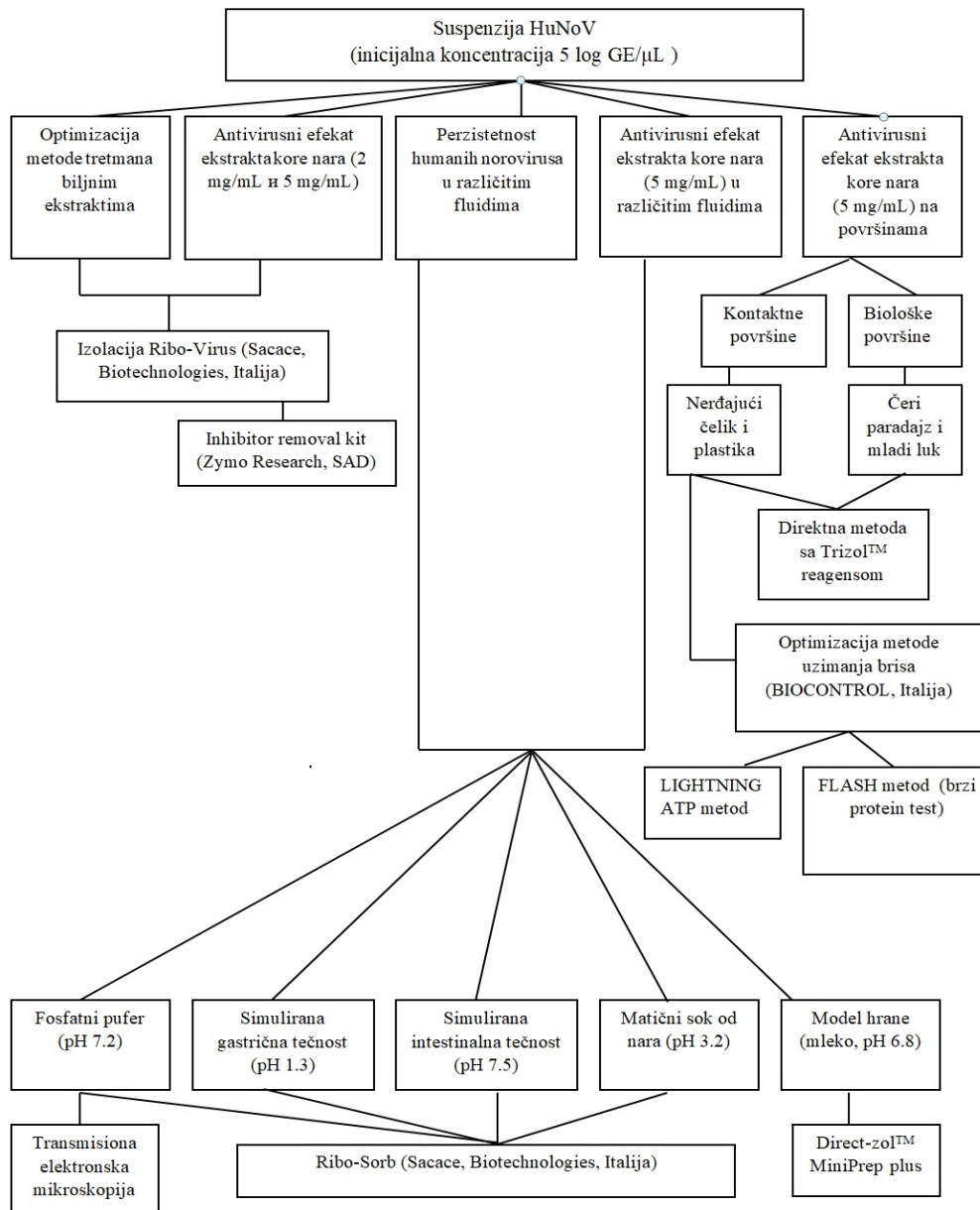
Drugi deo eksperimenata je analiziran na savremenom uređaju Mic Real Time PCR Cyler koji koristi najnoviji softver (BioMolecular Systems, Australija). Reakcije su se izvodile u Mic tubicama (zapremina uzorka 5 µL).

Identifikacija, detekcija i kvantifikacija virusnih uzročnika izvršena je upotrebom komercijalnih kitova prema potrebi eksperimenta (Tabela 4):

- Kit Quantification of Norovirus genotype 1 and 2 (Primer™ Ltd, genesing, UK) je korišćen za pripremu standardne krive; identifikaciju i kvantifikaciju norovirusne RNK, kao i posle tretmana sa MBE. Interna ekstrakciona kontrola detektovana je na drugom kanalu označenom žutom bojom (Yellow), a Ct vrednosti se pojavljuju između 31 ± 3 ciklusa.
- Detekcija i kvantifikacija HuNoV sa kontaktnih površina (nerđajući čelik i plastika) nakon tretmana sa dezinfekcionim sredstvima izvršena je korišćenjem Fast Gene IC Green One Step miksa, na uređaju Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems StepOne, Thermo Scientific™, SAD).
- Detekcija i kvantifikacija HuNoV RNK iz PBS, SGF, SIF, PJ, mleka, sa bioloških površina pre/posle tretmana sa PPE izvršena je na uređaju Mic Real Time PCR Cyler (BioMolecular Systems, Australija) sa Rotavirus/Norovirus/Astrovirus Real-TM kitom (Sacace Biotechnologies, Italija). Ovaj uređaj je nov na tržištu, dizajniran da detektuje izolovanu RNK u minimalnoj zapremini od 5 µL. Prednosti uređaja su ekonomičnost PCR reagenasa, savremen i unapređen softver čime je ubrzano dobijanje rezultata reakcije.

4.6. Transmisiona elektronska mikroskopija

Suspenzija HuNoV (PBS) finalne koncentracije 10^5 GE/ μ L služila je kao netretirana kontrola i suspenzija koja je tretirana sa PPE (5 mg/mL) analizirani su transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM). Uzorci su inkubirani u trajanju od 1 h na temperaturi od 37°C. Nakon završene inkubacije, uzorci su pripremljeni za TEM analizu. Prvo su fiksirani sa glutaraldehidom do finalne koncentracije 2.5%. Fiksirani uzorci su naneti na mikroskopsku mrežicu, osušeni na RT i isprani destilovanom vodom. Negativno bojenje je vršeno sa 4% uranil acetatom (Ultra Stain I). Uzorci su analizirani korišćenjem uređaja Leica EM Stain (Microsystems, Austria) i posmatrani na SM 12 transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI, Holandija) na 80 kV. Digitalne slike dobijene su korišćenjem iTEM MegaView CCD kamere.



Slika 23. Prikaz metoda korišćenih u disertaciji i šema plana rada

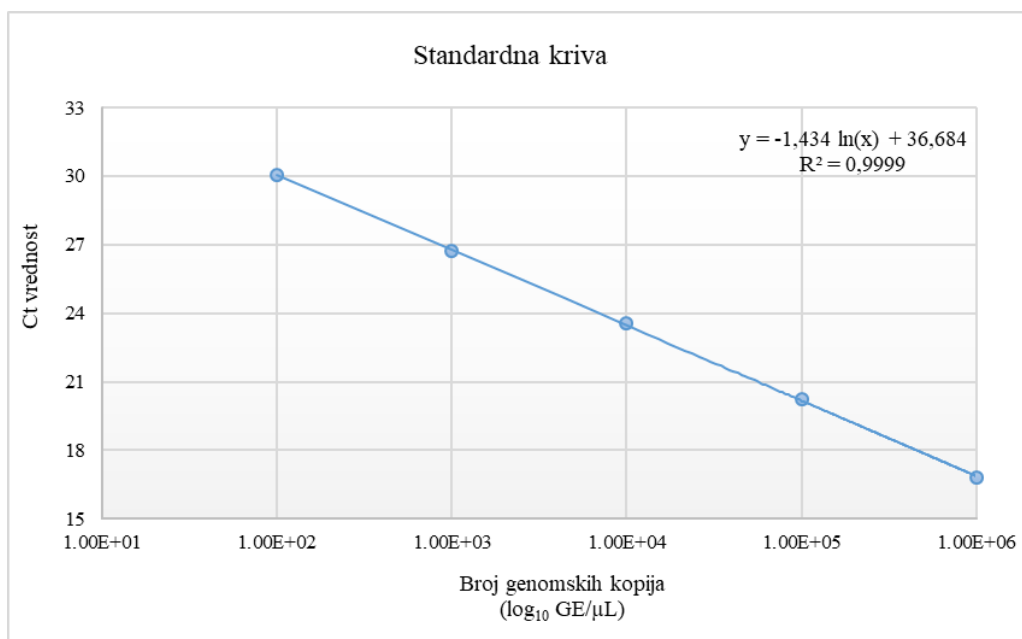
4.7. Statistička analiza

Sve navedene analize izvršene su u tri ponavljanja u tri nezavisna eksperimenta. Navedeni eksperimenti su statistički obrađeni i analizirani, grafički i tabelarno prikazani u zavisnosti od eksperimenta. Za statističku obradu korišćen je paket *Statistical Package for Social Sciences - SPSS 23* (IBM, SAD). Numerička obeležja su prikazana putem srednjih vrednosti (aritmetička sredina) i merom varijabiliteta (standardna devijacija). Komparacija vrednosti numeričkih obeležja između dve grupe vršena je primenom Studenovog T-testa, dok je za poređenje između više grupa, primenjena jednosmerna analiza varijanse ANOVA i Tukey post-hoc test. Statistička značajnost je analizirana na nivou: $p < 0,05$.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

5.1. Kvantifikacija humanih norovirusa u suspenziji

Metodom apsolutne kvantifikacije primenom standarda poznate koncentracije određen je broj humanih norovirusa u suspenziji (PBS). Kapsid označen kao pozitivna kontrola (standard) služio je za dobijanje standardne krive (**Grafik 1**). Uzorci nepoznate koncentracije HuNoV su analizirani i poređeni sa standardom poznate koncentracije. Koeficijent korelacije pokazuje koliko standardna kriva odgovara ispitivanim uzorcima i iznosila je za sve uzorke $R=0,9999\%$, što je u skladu sa standardima za primenu ovakvog načina analize. Metodom apsolutne kvantifikacije određen je broj humanih norovirusa u 1% suspenziji (PBS) i iznosi u proseku $6 \log_{10} \text{GE}/\mu\text{L}$. Za dalje eksperimente koristila se 1% suspenzija koja je prema potrebama analize razblažena do ciljane koncentracije.



Grafik 1. Standardna kriva dobijena reakcijom RT-qPCR na instrumentu Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

5.2. Antivirusni potencijal ekstrakta lekovitih biljaka

Savremena medicina i proizvodnja hrane se sve više okreću ka alternativnim prirodnim antimikrobnim jedinjenjima koja direktno ili indirektno utiču na zdravlje ljudi. Biološki aktivna jedinjenja iz biljaka, ekstrakti i etarska ulja su od davnina poznata po nutritivnom, antioksidativnom, antimikrobnom potencijalu i primeni u prevenciji mnogih bolesti (Gutiérrez-del-Río., 2018; Zalán, 2015). Antivirusni potencijal 11 ekstrakta lekovitih biljaka je testiran u različitim koncentracijama (0,2; 1,0; 2,5 mg/mL). Ekstrakti su rastvoreni sa 5% DMSO i u mešavini 5% DMSO + 30% EtOH. Primećeno je da se ekstrakti nisu dobro rastvarali u 5% DMSO, odnosno da je formiran talog koji je kod nekih uzoraka izražen. U mešavini rastvarača 5% DMSO + 30% EtOH rastvorljivost ekstrakta se znatno poboljšala, što je uticalo na poboljšanje antivirusne aktivnosti. Potencijal ekstrakta može se definisati koncentracijom bioaktivnih jedinjenja, rastvarača (metanola, etanola, vode i drugih) i odabranom koncentracijom (Ahmad et al., 2017). Takođe, 5% DMSO i 30% EtOH su testirani na HuNoV i nije dobijena redukcija virusa u suspenziji. Ekstrakti: SRE, SSE, MAE su imali talog pri koncentraciji 0,4 mg/mL, dok je GLE imao srednju količinu taloga. Svi ostali ekstrakti su se dobro rastvorili ili su imali zanemarljivu količinu taloga (Tabela 6).

Tabela 6. Uticaj rastvarača na promenu rastvorljivosti i potencijala suvih ekstrakta lekovitih biljaka primenom rastvarača 5% DMSO i mešavine 5% DMSO + 30% EtOH.

Ekstrakti	Šifra	Rastvarač	
		5% DMSO	5% DMSO + 30% EtOH
		Prisutnost taloga	
<i>Sideritis raeseri</i>	SRE	Ima	Malo
<i>Gentiana asclepiadea</i>	GAE	Vrlo malo	U tragovima
<i>Aronia melanocarpa</i>	AMLE	Malo	Nema
<i>Gentiana lutea</i>	GLE	Ima	U tragovima
<i>Helichrysum plicatum</i>	HPE	Malo	U tragovima
<i>Hypericum perforatum</i>	HyPE	Ima	Nema
<i>Aronia melanocarpa</i>	AMFE	Malo	Nema
<i>Satureja subspicata</i>	SSE	Malo	Nema
<i>Mahonia aquifoli</i>	MAE	Ima	Nema
<i>Punica granatum</i>	PPE	Malo	Nema
<i>Vitis vinifera</i> var. Prokupac	WPE	Malo	Nema

Biljni ekstrakti su bogati polifenolnim jedinjenjima koji mogu da inhibiraju PCR reakciju (Schrader et al., 2012), zbog čega su u navedenim eksperimentima prvo testirani u malim koncentracijama. Antivirusna efikasnost različitih koncentracija LBE za redukciju HuNoV čestica, testirana je na 37°C sa kontaktnim vremenom 1h u *in vitro* uslovima (Tabela 7). Odabrana temperatura predstavlja približnu temperaturu ljudskog tela. Suspenzija HuNoV pripremljena je u 5% DMSO, 30% EtOH i u njihovoj mešavini, pri čemu navedeni rastvarači nisu imali uticaj na redukciju virusnih čestica. Suspenzija norovirusa pripremljena u 5% DMSO za navedene eksperimente se koristila kao netretirana kontrola. Redukcija HuNoV > 1 log₁₀ GE/μL je dobijena sa koncentracijom 1 mg/mL sa ekstraktom lista *Aronia melanocarpa* (AMLE), ekstraktom uparenog vina Prokupac (WPE) i ekstraktom *Hypericum perforatum* (HyPE) (Živković et al., 2018). Akram et al. (2018) su publikovali podatke 1982-2017 o antivirusnom potencijalu *Hypericum spp.* protiv različitih virusnih bolesti kao što su influenza, hepatitis, HIV, herpes simpleks virus a za koje su sprovedene kliničke studije. *Hypericum perforatum* L. je u narodu poznat kao kantarion ili gospina trava, a predstavlja bogat izvor hipercina, pseudohipercina, hiperforina, hlorogenske, neohlorogenske, kafeinske, 2,4-dihidroksibenzojeve kiseline, kvercetina, kvercitrina, rutinina, (+) katehina, (-) epikatehina i drugih bioloških aktivnih jedinjenja. Zbog svog hemijskog sastava i farmakološkog efekta dobro je proučavan i odavnina se koristi u kozmetici ili alternativnoj medicini (Cirak et al., 2016, de Carvalho Meirelles et al., 2019). Nedavno je antivirusni efekat HyPE prvi put potvrđen na bronhitis virus. Tretman HyPE se sastojao od 120 mg/kg tokom 5 dana, rezultati su ukazali na redukciju virusa, smanjenje zapaljenja dušnika i bubrega. Za redukciju bronhitis virusa koristila se znatno viša koncentracija HyPE u odnosu tretman na HuNoV (Chen et al., 2019). Takođe, najnoviji podaci ukazuju na značajne zdravstvene i antivirusne efekte ovog ekstrakta u ciklusu SARS-CoV-2 infekcije (Bajrai et al., 2021). Farmaceutske kompanije naručito u Evropi koriste *Hypericum perforatum* kao antimikrobno i antiinflamatorno sredstvo (Süntar et al., 2015; Bölgen et al., 2020).

Pored antivirusnog efekta HyPE pokazuje značajan antibakterijski (Saddiqe et al., 2020) i antifungalni potencijal (Tocci et al., 2018).

Neki od ekstrakata kao što su *Hypericum perforatum*, plod *Aronia melanocarpa* (AMFE) i *Punica granatum* peel (PPE) pokazali su bolju redukciju HuNoV kada su prvo rastvoreni u mešavini 30% EtOH sa 5% DMSO ($p < 0,05$) (Tabela 7). Dobijena redukcija HuNoV AMFE (1 mg/mL) je značajna ukoliko se uzme u obzir da je koncentracija ekstrakta minimalna, a plod bogat izvor polifenola. *Aronia melanocarpa* je poslednjih godina doživela ekspanziju popularnosti zbog antioksidativnog, antiinflamatornog, antimutagenog efekta, pozitivnog uticaja u prevenciji dijabetesa i opšteg zdravlja ljudi. Najčešće se koristi kao sok, čaj ili suplement (Borowska and Brzóska, 2016). Etanolni ekstrakt *Aronia melanocarpa* je pokazao značajnu antibakterijsku aktivnost prema *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii* i *Salmonella* Enteritidis (Denev et al., 2019; Efenberger-Szmechtyk et al., 2020). Na osnovu pregledane literature ovo su prvi objavljeni rezultati o antinorovirusnoj aktivnosti ekstrakta *Aronia melanocarpa* (Živković et al., 2018). Antivirusni potencijal ploda aronije testiran je na različite podtipovima influenza virusa u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Njihov zaključak je da antivirusna aktivnost ploda aronije potiče od bioaktivnih jedinjenja kao što je elagna kiselina i miricetin (iz klase flavanoida) (Park et al., 2013). Banjari et al. (2017) su objavili podatke koji ukazuju da bioaktivna jedinjenja iz aronije povoljno utiču na zdravlje i imunitet, protiv kardiovaskularnih bolesti, avitaminoze, hipertenzije i drugih bolesti.

Takođe, dobijena je antinorovirusna aktivnost ekstrakta crnog vina srpske autohtone sorte vinove loze Prokupac, što spada u prve zvanične objavljene rezultate do sada (Živković et al., 2018). Resveratrol je glavni sastojak crvenog vina i predstavlja polifenolno jedinjenje koje je proučavano zbog svoje farmakološke vrednosti. Resveratrol je pokazao antivirusni efekat u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Njegov antivirusni potencijal je ispitan na influenci, hepatitisu C, variceli i respiratornom sinicijalnom virusu (Zhang et al., 2013; Cheng et al., 2014; Zhang et al., 2017). Dobijena antinorovirusna aktivnost sa WPE u našim eksperimentima je u skladu sa istraživanjima Oh et al. (2015) koji su pronašli da crveno vino i resveratrol imaju antivirusno dejstvo na surogate HuNoV (MNV-1 i FCV) u početnom stadijumu infekcije.

Redukcija HuNoV u intervalu od 0,5-1 \log_{10} GE/ μ L dobijena je sa koncentracijama od 0,4 mg/mL WPE, PPE i HyPE; 1,0 mg/mL GAE i AMFE; 2,5 mg/mL GAE i AMFE ($p < 0,05$). Antinorovirusna aktivnost ekstrakta za redukciju HuNoV koja je na nivou $< 0,5 \log_{10}$ GE/ μ L nije se smatrala efikasnom ($p > 0,05$). Dobijena redukcija je značajna, ukoliko se uzme u obzir da su testirani ekstrakti u nižim koncentracijama nego što se inače koriste. Drugi ispitani MBE su pokazali redukciju ispod 0,5 \log_{10} GE/ μ L i nisu bili od značaja za dalje ispitivanje na antinorovirusnu HuNoV (Tabela 7). Dalja optimizacija navedene metode izolacije norovirusne RNK nakon tretmana sa ekstraktima medicinskih biljaka i primenom većih koncentracija može biti tok budućih istraživanja. Na osnovu redukcije LBE, formiranja taloga, specifičnosti eksperimenata i inhibitornog uticaja na RT-qPCR u toku ponavljanja bez dodatnog prečišćavanja nakon tretmana, izabran je PPE za dalja i detaljna eksperimentalna istraživanja.

Tabela 7. Antivirusna aktivnost ekstrakta medicinskih biljaka na humani norovirus koji se prenosi putem hrane sa kontaktnim vremenom 1h na 37°C.

Ekstrakt	Koncentracija lekovitih biljnih ekstrakta				
	0,4 (mg/mL)		1 (mg/mL)		2,5 (mg/mL)
	5% DMSO ^a	5% DMSO + 30% EtOH	5% DMSO ^a	5% DMSO + 30% EtOH	5% DMSO ^a
	Redukcija HuNoV ^{b,c,d} (log ₁₀ genomskih ekvivalenata/μL)				
SRE	0,33 ± 0,01	NR	0,28 ± 0,03	-	-
GAE	0,49 ± 0,04	-	0,59 ± 0,01	-	0,79 ± 0,07
AMLE	0,45 ± 0,02	-	1,06 ± 0,05	-	-
GLE	0,45 ± 0,01	-	0,46 ± 0,01	-	0,26 ± 0,04
WPE	0,79 ± 0,02	0,30 ± 0,01	1,21 ± 0,01	-	-
HPE	-	0,48 ± 0,03	0,22 ± 0,02	-	0,32 ± 0,01
HyPE	ND	0,93 ± 0,01	ND	1,38 ± 0,01	-
AMFE	0,12 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,29 ± 0,05	0,66 ± 0,02	0,55 ± 0,02
SSE	0,23 ± 0,01	NR	NR	-	0,13 ± 0,01
MAE	NR	-	0,21 ± 0,01	-	NR
PPE	0,70 ± 0,03	0,83 ± 0,03	-	-	-

^aSuspenzija HuNoV u 5% DMSO (netretirana kontrola, inicijalna koncentracija 5 ± 0,04 GE/μL) služila je za poređenje sa LBE.

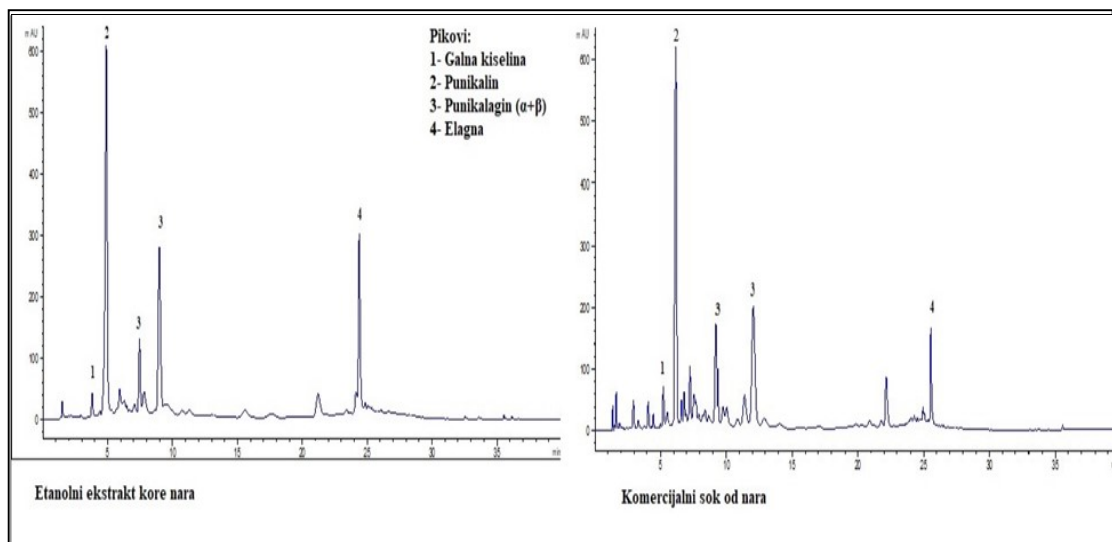
^bNR - nema redukcije

^cND - nije detektovano

^d- - Nije rađeno

5.3. Hemijska analiza ekstrakta kore (PPE) i matičnog soka ploda nara (PJ)

Kora nara je poznata kao bogat izvor fenola. U ispitivanom uzorku PPE, spektrofotometrijski detektovan je visok sadržaj fenola 320,16 mg GAE/g i tanina 17,37 %. HPLC analizom određene su dominantne aktivne komponente: punikalin (197,13 mg/g) i punikalagin (86,93 mg/g) (Slika 24 i Tabela 8).



Slika 24. HPLC hromatogram ($\lambda = 260$ nm) 70% etanolnog ekstrakta kore nara i komercijalnog soka od nara

Tabela 8. Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g DW za PPE i mg GAE/100 mL matičnog soka nara), ukupan sadržaj tanina (%) i individualne polifenolne komponente (mg/g DW) u ekstraktu kore ploda nara (PPE) i matičnog soka od nara (PJ).

Komponente	PPE	PJ
Ukupan sadržaj fenola	320,16 ± 2,39	146,00 ± 2,01
Ukupan sadržaj tanina	17,37 ± 0,64	5,21 ± 0,22
Punikalagin	54,23 ± 1,65	43,23 ± 1,45
Punikalin	197,13 ± 3,48	86,93 ± 2,45
Galna kiselina	6,83 ± 0,53	6,69 ± 0,33
Elagna kiselina	25,42 ± 0,80	6,49 ± 0,71

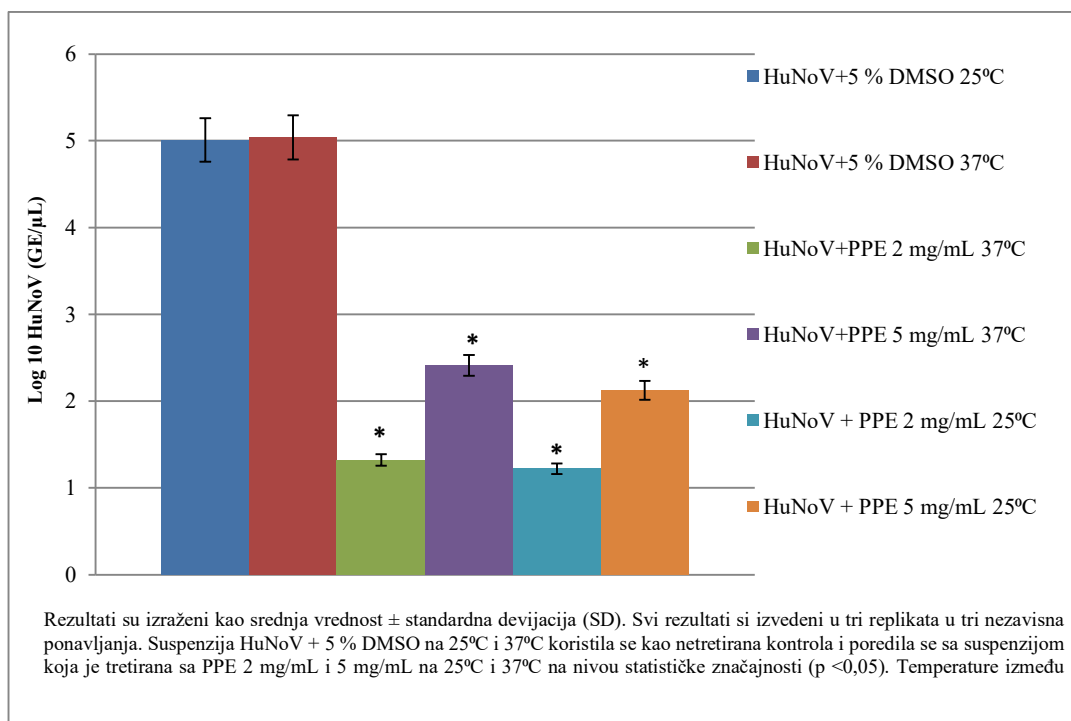
Ekstrat kore ploda nara je odabran za dalje eksperimente zbog značajne redukcije HuNoV i minimalne inhibicije na RT-qPCR reakciju. Visoka koncentracija ukupnih fenola (320,16 mg GAE/g) i tanina (17,37%) u našem uzorku je u skladu sa rezultatima koji su objavili Hasnaoui et al. (2014) i Li et al. (2015) za njihov uzorak PPE sadrži visoku koncentraciju ukupnih fenola (261,70 mg GAE/g). HPLC analizom uzoraka ekstrakta i matičnog soka ploda nara utvrđene su dominantne komponente punikalina (197,13 mg/g za PPE i 86,93 mg/g za PJ), zatim punikalagin (54,23 mg/g za PPE i 43,23 mg/g za PJ). Moradi et al. (2019) su objavili analizu hemijskog sastava njihovog uzoraka PPE koji sadrži približnu koncentraciju ukupnih fenola (233 mg GAE/g) kao što je dobijeno drugim istraživanjima, ali frakcija dobijena etilacetatom sadrži značajno veću koncentraciju ukupnih fenola (629 GAE/g). Sadržaj elagne kiseline iznosio je u komercijalnom PJ (6,49 mg/g), dok je znatno viši u PPE (25,42 mg/g). Slične rezultate objavili su Li et al. 2015 da su punikalagin i elagna kiselina dominantne komponente analiziranih polifenola koji su ekstrahovani iz kore ploda nara sakupljenih iz različitih voćnjaka u Kini. Komercijalni matični sok je deklarisan kao 100% prirodni sok nara, bez dodataka. Utvrđeno je da su koncentracije dominantnih bioaktivnih komponenti bile znatno niže: 86,93 mg/g (punikalina) i 43,23 mg/g (punikalagin) u odnosu na ekstrakt. Danas su dostupne različite formulacije soka kao 100% prirodni, sokovi sa različitim procentom nara (18-85%), gazirani i koncentraciji. Različitim analizama utvrđeno je da PJ ima tri puta veću antioksidativnu aktivnost nego crveno vino ili zeleni čaj (Gil et al., 2000) i 2-8x više nego što je detektovana u soku od grožđa, brusnice, grejpa ili narandže (Rosenblat et al., 2006). Komercijalno dostupni sokovi su obično nutritivno osiromašeni i njihove karakteristike su određene sortom, procesom proizvodnje i načinom skladištenja. Koncentracija punikalagina je do osam puta manja u industrijski proizvedenom 100% soku od nara u odnosu na prirodno ceđeni (Mathon et al., 2019). U uzorku PJ koncentracija bioaktivnih jedinjenja je niža u odnosu na PPE. Niže koncentracije bioaktivnih jedinjenja reflektovale su se kroz smanjenu redukciju HuNoV u poređenju sa PPE.

5.4. Antivirusni potencijal ekstrakta kore nara u *in vitro* uslovima

5.4.1. Redukcija humanog norovirusa ekstraktom kore nara

Antivirusni efekat PPE je ispitan u *in vitro* uslovima u koncentraciji 2 mg/mL i 5 mg/mL na temperaturi 25°C i 37°C sa kontaktnim vremenom 1h. Redukcija HuNoV u suspenziji nakon tretmana sa PPE na 37°C je $1,32 \pm 0,06$ (2 mg/mL); $2,4 \pm 0,09$ (5 mg/mL) \log_{10} GE/ μ L ($p < 0,05$) (Grafik 2). Redukcija nakon tretmana sa PPE na 25°C je $1,22 \pm 0,01$ \log_{10} GE/ μ L (2 mg/mL) i 2,04

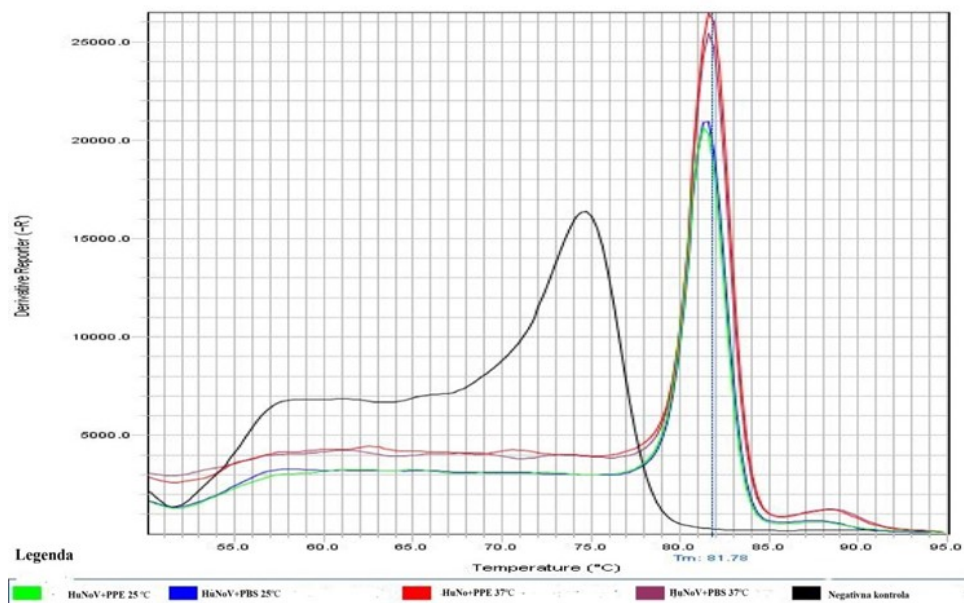
$\pm 0,05 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ (5 mg/mL). Dobijeni rezultati ukazuju da nema statističke značajnosti između odabranih temperatura, odnosno da temperatura u intervalu od 25-37°C ne utiče statistički značajno na redukciju HuNoV ili poboljšanje delovanja PPE nakon 1 h ($p > 0.05$) (Grafik 2).



Grafik 2. Antinorovirusni efekat ekstrakta kore nara u suspenziji na 25 °C i 37°C.

Mnoge studije su ukazale na termičku stabilnost virusa i da temperature iznad 50°C nisu efikasne u inaktivaciji virusa. Joshi et al. (2015) su testirali uticaj ekstrakta semena grožđa (grape seed extract, GSE) na sobnoj temperaturi i 37°C, promenu redukcije sa povećanjem koncentracije, kontaktnog vremena ekstrakta i surogata HuNoV (FCV, MNV i HAV). Koncentracija 2 mg/mL GSE redukovala je MNV i FCV ispod granice detekcije metode nakon 6 h na obe temperature. Navedeni podaci o termičkoj stabilnosti virusa su u skladu sa dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji, odnosno da nema statističke razlike između 25°C i 37°C.

Prema Sánchez i Bosch (2016) stabilnost virusa u hrani zavisi od tipa virusa, pH vrednosti, temperature, relativne vlažnosti i vrste hrane. Specifičnost amplifikacije netretirane suspenzije norovirusa i nakon tretmana norovirusa sa PPE na različitim temperaturama potvrđena je krivom topljenja specifičnom za norovirus ($T_m 81,78 \pm 0,22^\circ\text{C}$). Analiza krive topljenja sa jednim pikom ukazuje na formiranje jednog RT-qPCR proizvoda i odsustva nespecifičnih artefakta (poreklom iz PPE) i prajmer-dimera (Slika 25).

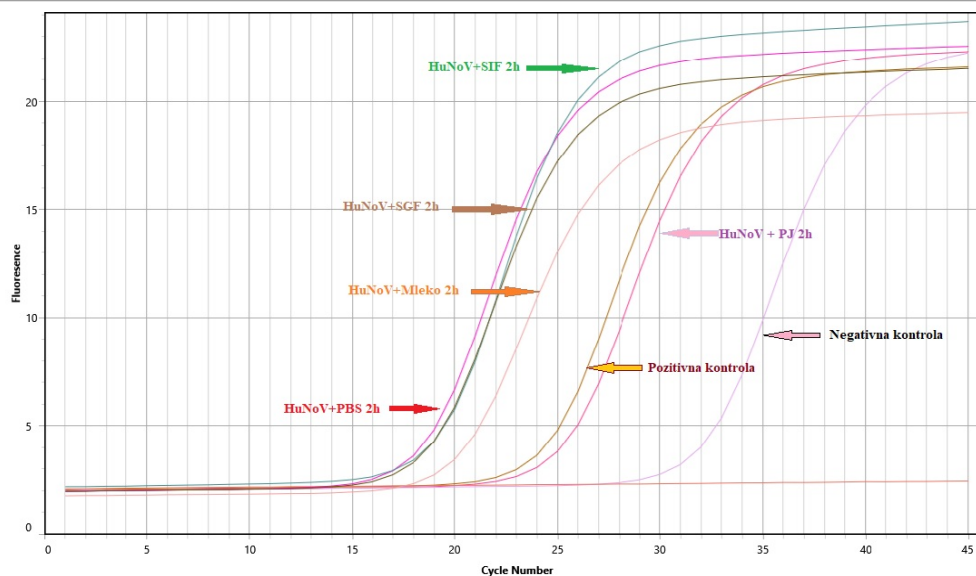


Slika 25. Kriva topljenja za sve amplikone je iznosila $81.78^{\circ}\text{C} \pm 0.22^{\circ}\text{C}$ što ukazuje na specifičnost RT-qPCR reakcije.

Galna i elagna kiselina predstavljaju dominantne fenolne kiseline u ekstraktima. Sadržaj fenola u ekstraktima se izražava preko mg galne kiseline. Testiran je antinorovirusni potencijal galne i elagne kiseline (5 mg/mL) kao dominantnih organskih kiselina u ekstraktu kore nara. Suspenzija HuNoV je inkubirana sa kiselinama na 37°C i nakon 1 h nije dobijena statistički značajna redukcija ($p > 0,05$). Galna kiselina i kvercetin predstavljaju glavne komponente, izolovane iz prirodnog soka od kupine ali nisu imale redukcionu sposobnost na surogate HuNoV (Oh et al., 2012). Punikalagin, luteonil, elaginska i kafeinska kiselina izolovane iz ekstrakta nara koristile su se za ispitivanje antivirusnog potencijala influence. Dobijeni rezultati istraživanja su ukazali da je najefikasniji punikalagin (Haidari et al., 2009). Polifenoli iz ekstrakta i prirodnih sokova predstavljaju obećavajuća jedinjenja za antivirusni tretman. Antimikrobna aktivnost PPE može se objasniti sastavom i širokim spektrom polifenolnih komponenti (delfidin, cijanidin, pelargonidin, galski i elagični derivati, punikalin, punikalagin i drugi) (Al-Hassnawi, 2017).

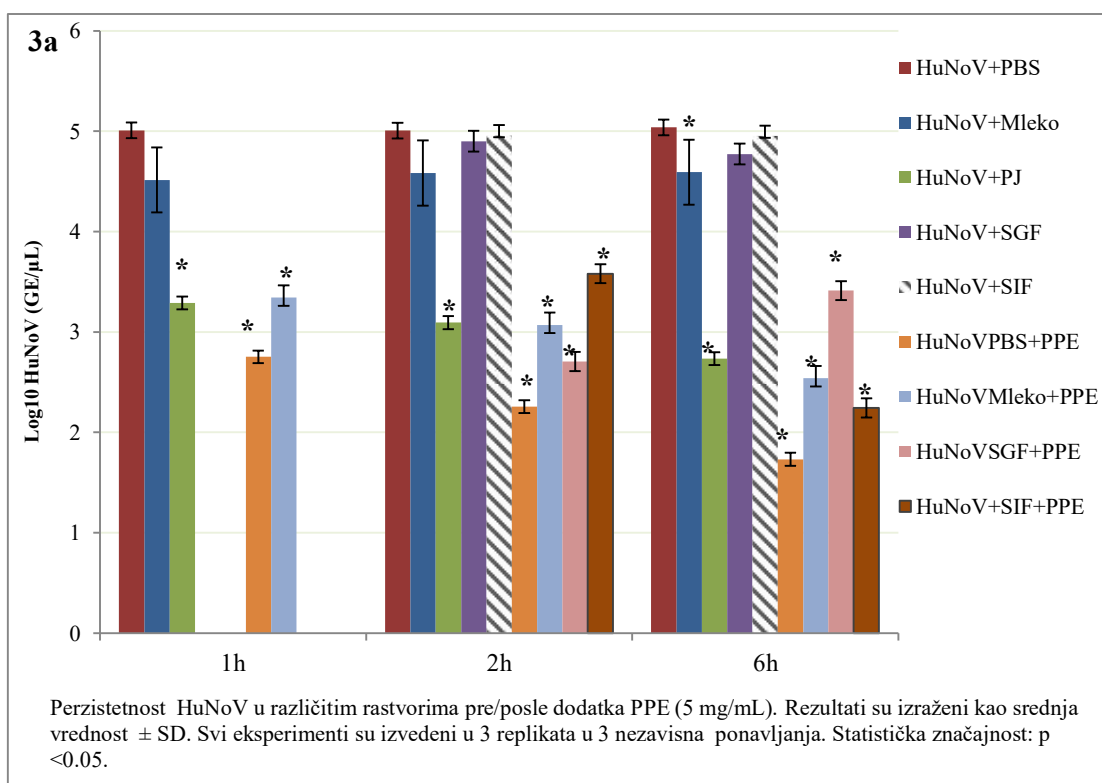
5.4.2. Redukcija humanih norovirusa u modelu hrane i simuliranim gastrointestinalnim fluidima

Suspenzija HuNoV u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,2; netretirana kontrola) je služila za poređenje perzistencije HuNoV u gastričnom fluidu (SGF, pH 1,3), intestinalnom fluidu (SIF, pH 7,2), mleku sa redukovanim sadržajem masti (0,5% m.m.; pH 6,2), komercijalnom matičnom soku od nara (PJ; pH 3,2) i za testiranje antivirusne aktivnosti PPE. Inicijalna koncentracija HuNoV za sve rastvore je $5,01 \pm 0,04 \log_{10} \text{GE}/\mu\text{L}$. Kvantifikacija HuNoV izvršena je apsolutnom kvantifikacijom, primenom standardne krive (Grafik 1). Smeše HuNoV u PBS, mleku i PJ su inkubirane 1 h, 2 h i 6 h na 37°C (Grafik 3a, Slika 26). U ranijim eksperimentima, potvrđeno je da PBS nema uticaj na redukciju HuNoV (Verhaelen et al., 2012; Kotwal i Cannon, 2014) što je potvrđeno i u našim eksperimentima (Živković et al., 2018).



Slika 26. Prikaz amplifikacionih kriva perzistencije humanih norovirusa u fosfatnom puferu (PBS), simuliranom gastričnim (SGF), intestinalnim (SIF), mleku i soku (PJ) nakon 2h.

Pored toga, ispitana je perzistencija HuNoV pri različitim pH vrednostima i kroz statističku obradu podataka sagledao se uticaj niske pH vrednosti na antivirusni efekat PPE. Postoji veliki broj studija koje proučavaju antivirusnu aktivnost prirodnih ekstrakata, kao zamena za hemijska jedinjenja koja se dodaju u hranu i imaju štetan efekat na zdravlje ljudi. Antivirusni efekat PPE (5 mg/mL) na HuNoV je testiran u mleku, SGF, SIF i redukciona sposobnost se poredila sa PJ i netretiranom kontrolom. Antivirusni efekat PPE (5 mg/mL) je testiran na HuNoV (koncentracije $5 \pm 0,04 \log_{10}$ GE/ μ L; PBS), nakon inkubacionog vremena na 37°C, detektovano je $2,60 \pm 0,04$ (1 h); $2,18 \pm 0,05$ (2 h) i $1,62 \pm 0,03 \log_{10}$ GE/ μ L (6 h) ($p < 0,05$) (Grafik 3a, Slika 26). Statistički značajno smanjenje utvrđeno je RT-qPCR, a antivirusni efekat PPE je potvrđen TEM analizom (Slika 29). Prilikom analize na TEM i korišćenjem različitih uveličanja nakon tretmana sa PPE (1 h) uočene su morfološke promene kapsida HuNoV u odnosu na netretiranu kontrolu, HuNoV (PBS). Slične morfološke promene uočene su nakon tretmana sa ekstraktom semena grožđa na čestice slične virusu HuNoV GII.4 (Li et al., 2012). Takođe, morfološke promene u strukturi FCV i MNV nakon tretmana sa proantocijanima borovnice su slične sa promenama u strukturi HuNoV nakon tretmana sa PPE (Joshi et al., 2017). Međutim, mehanizam delovanja ekstrakta i bioaktivnih jedinjenja još uvek nije potpuno jasan i zahteva dalja istraživanja. Slično istraživanje antivirusnog efekta vršeno je sa polifenolima nara u koncentracijama 2 mg/mL, 8 mg/mL i 32 mg/mL na surogate HuNoV (FCV-F9, MNV-1 i MS2), nakon 1 h na sobnoj temperaturi. Redukcija FCV-F9 dobijena je sa polifenolima u odabranim koncentracijama pri čemu je virus bio ispod granice detekcije metode (Su et al., 2010). Pored surogata HuNoV, antivirusni efekat etanolnog rastvora PPE testiran je i na virus influence i adenoviruse, pri čemu je dobijena značajna inhibicija (Karimi et al., 2020; Moradi et al., 2019). Zabeleženi su i najnoviji podaci o antivirusnom delovanju etanolnog ekstrakta nara i punikalagina prema alfa soju Covid-19 virusa (Salles et al., 2021). Danas, PPE se može kupiti inkapsuliran u obliku suplementa ili kao čaj koji se kao prirodna supstanca može koristiti u jačanju imuniteta. Jedinjenja izolovana iz PPE potencijalno mogu da utiču na jačanje imuniteta i kao funkcionalna hrana mogu da budu korisni u prevenciji infekcije HuNoV. Najnoviji podaci ukazuju na mogućnost korišćenja u prevenciji bolesti kao što je Covid-19 (Singh et al., 2020). Nekoliko studija je pokazalo da polifenoli iz PPE mogu da inhibiraju i redukuju aktivnost virusnog kapsida što može biti značajno u tretiranju SARS-CoV-2 infekcije. S obzirom da je dijareja jedan od simptoma i Covid-19 i HuNoV infekcije, korišćenje PPE možda može biti značajno kao preventivna mera ili olakšavanje simptoma. Naravno, svaka preporuka zahteva dodatno dalje ispitivanje.

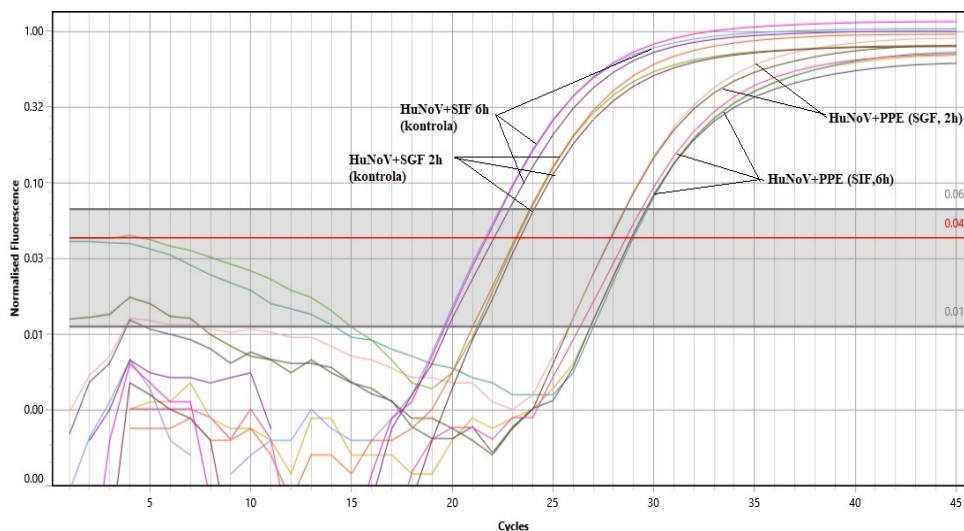


Grafik 3a. Perzistencija humanih norovirusa pod uticajem pH vrednosti < 7 u različitim rastvorima.

Deo istraživanja ove disertacije obuhvatio je perzistentnost HuNoV u različitim suspenzijama i uticaj niske pH vrednosti na antivirusni efekat PPE. Perzistentnost HuNoV testirana je u mleku kao modelu hrane koji ima kompleksni matriks, koje zbog prisustva različitih složenih jedinjenja može pokazati protektivni efekat prema HuNoV pri izolaciji i delovanju PPE. Prilikom delovanja PPE, antivirusni efekat je smanjen u mleku za oko 20% nakon 1 h, 2 h i 6 h u poređenju sa redukcijom HuNoV (PBS) nakon dodatka PPE ($p < 0,05$) (Grafik 3 a, b, c). Perzistentnost HuNoV u mleku sa niskim procentom mlečne masti nakon tretmana sa PPE (5 mg/mL) je $3,34 \pm 0,08$ (1 h), $3,07 \pm 0,04$ (2 h) i $2,54 \pm 0,1$ (6 h) GE/ μ L. Rezultati su ukazali na to da u poređenju sa drugim rastvorima antivirusna efikasnost PPE u kompleksnom matriksu hrane ima sposobnost da redukuje virus za oko 91% (Grafik 3b). Studije u kojima je ispitivana antibakterijska aktivnost biljnih ekstrakta na *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* i *Pseudomonas fluorescens* u matriksu mleka ukazuje na smanjenu antibakterijsku aktivnost u zavisnosti od procenta mlečne masti. Slična studija je urađena ispitivanjem crnog čaja na *Streptococcus mutants*, čija je antibakterijska aktivnost smanjena dodatkom mleka. Ovaj fenomen se objašnjava interakcijom bioaktivnih jedinjenja sa komponentama iz mleka i protektivnim efektom (Hasnaoui et al., 2014; Horm et al., 2012). Takođe, u jednoj studiji je testiran antibakterijski efekat esencijalnog ulja crnog cimeta na *L. monocytogenes* u mleku, redukcija u punomasnom mleku je bila samo 1 log CFU/mL, dok je u uzorku sa redukovanim procentom mlečne masti redukcija bila 3 log CFU/mL (Cava et al., 2007).

Perzistentnost HuNoV i antivirusna efikasnost PPE je ispitana u simuliranim gastričnim (SGF, pH 1,3) i intestinalnim (SIF; pH 7,5) fluidima. Mesto umnožavanja HuNoV je gastrointestinalni trakt, zbog čega se pretpostavlja da niska pH vrednost u SGF, kao ni hemijski sastav SIF-a, nisu imali uticaj na redukciju virusa. Suspenzije HuNoV u SGF i SIF su inkubirane na 2 h i 6 h, navedena inkubaciona vremena na 37°C su odabrana kako bi se simuliralo vreme prolaska oralno konzumiranih komponenti kroz gastrointestinalni trakt. U poređenju sa kontrolom (HuNoV u PBS, $5,01 \pm 0,04$ log₁₀ GE/ μ L) uticaj pH vrednosti na smanjenje broja čestica HuNoV u SGF (pH 1,3; 2 h) i SIF (pH 7,5; 6 h) nije statistički značajan ($p > 0,05$) (Grafik 3a, Slika 26). Jedna od studija

ukazuje da pH 2-3 kao i enzimi koji učestvuju u procesu varenja (pepsin, tripsin i himotripsin) nisu izazvali oštećenja VLPs čestica nakon 4 h (Chassaing et al., 2020). Koncentracija VLPs čestica pri pH 1,3 nakon 4 h je značajno krenula da opada, dok se za HuNoV GII.4 nije menjala. Stablnost kapsida se razlikovala između VLPs čestica i HuNoV koji pripadaju istom genotipu (Robin et al., 2019; Chassaing et al., 2020). Pri niskoj pH vrednosti, PPE je imao značajno antivirusno delovanje na HuNoV (SGF) i nakon 2 h detektovano je $2,7 \pm 0,09 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$) (Grafik 3a, Slika 27).

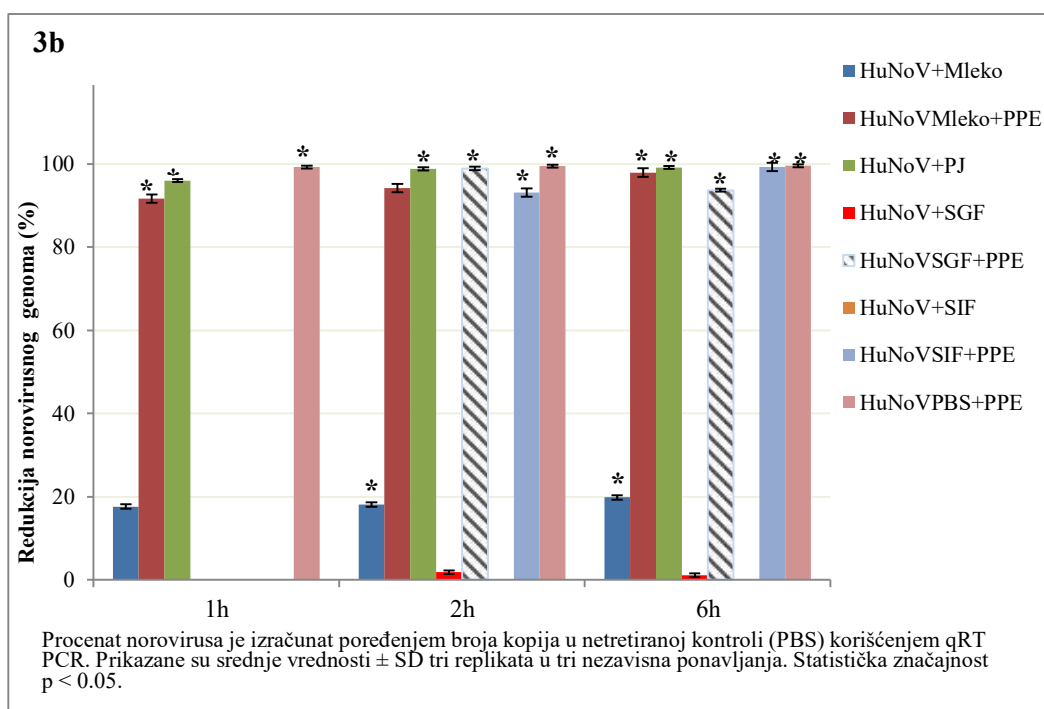


Slika 27. Amplifikacioni plot perzistencije humanih norovirusa u simuliranim gastrointestinalnim uslovima i tretman sa ekstraktom kore nara.

Na osnovu rezultata i poređenja sa antivirusnim efektom PPE u PBS-u, dobijena je manja redukcija HuNoV sa PPE nakon 6 h u SGF. Uticaj niske pH vrednosti (SGF) na PPE nakon 6 h se odrazio kroz smanjenu antivirusnu aktivnost što je manifestovano većom koncentracijom virusa ($3,41 \pm 0,06 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$) u poređenju sa uzorcima koji su bili u ispitivani u vremenu od 2 h i sa delovanjem PPE na HuNoV pri istoj pH, nakon 6 h ($p < 0,05$). Degradacija biološki aktivnih jedinjenja pri niskoj pH vrednosti potvrđena je u istraživanju Vermaak et al. (2009) testiranjem antibakterijske aktivnosti 12 biljnih ekstrakta u simuliranim gastrointestinalnim uslovima. Nakon 6h pri niskoj pH vrednosti dobijeni rezultati su ukazali na smanjenu antibakterijsku aktivnost. Takođe, Falcó et al. (2018) su ispitivali antivirusnu aktivnost ekstrakta zelenog čaja na MNV i HAV pri neutralnoj (pH 7,0) i kiselj sredini (pH 5,5), pri čemu je bolja redukcija dobijena u neutralnoj sredini. U kiselj sredini sastav ekstrakta se promenio, odnosno došlo je do degradacije derivata katehina.

Koncentracija HuNoV u SIF (pH 7,5) nakon tretmana sa PPE je značajno smanjena nakon 6 h. Redukciona moć PPE u SIF se izražava detekcijom HuNoV koja je iznosila $3,61 \pm 0,09 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ (2 h) i $2,24 \pm 0,02 \log_{10} \text{ GE}/\mu\text{L}$ (6 h) ($p < 0,05$) (Grafik 3a). Dobijena redukcija HuNoV u SGF i SIF je značajna, ukoliko se uzme u obzir da u *in vivo* uslovima, prilikom konzumiranja namirnica direktan uticaj pH vrednosti u želucu će verovatno biti smanjen (Joshi et al., 2017). Značajno je poznavanje ovih činjenica prilikom odabira efikasne koncentracije i vremena koje je potrebno za inaktivaciju ciljanog virusa.

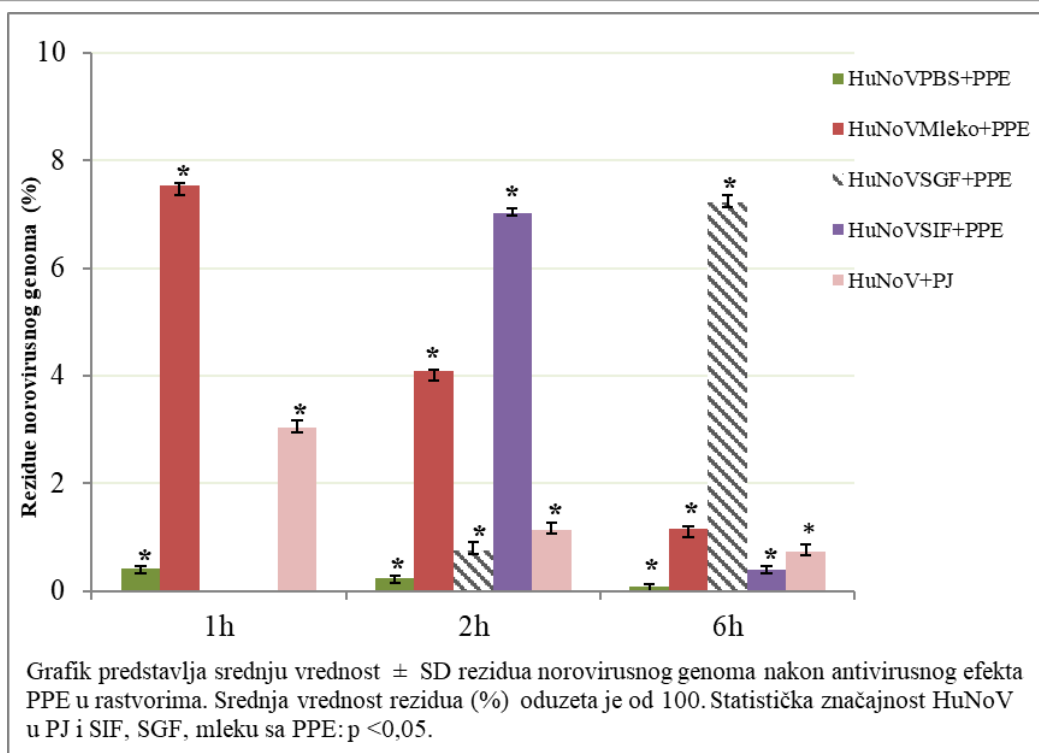
Rezultati su ukazali na sposobnost PPE da redukuje 99 % HuNoV u PBS. Takođe, antivirusni efekat PPE u SGF (2 h) i SIF (6 h) je 99 % (Grafik 3b). Niska pH vrednost nakon 2 h u SGF ne utiče značajno na antivirusni efekat PPE. Međutim, niska pH vrednost SGF (pH 1.3) nakon 6 h se značajno odrazila na antinorovirusni efekat PPE i iznosi 93 % (Grafik 3b).



Grafik 3b. Redukcija HuNoV izražena u procentima u poređenju sa netritiranom kontrolom (HuNoV u PBS $5,01 \pm 0,04 \log_{10}$ GE/ μ L).

Perzistencija HuNoV u PJ (pH 3,3) je iznosila $3,28 \pm 0,06$ (1 h); $3,09 \pm 0,09$ (2 h) i $2,73 \pm 0,04$ (6 h) \log_{10} GE ($p < 0,05$) (Grafik 3a). U našim eksperimentima komercijalni PJ je redukovao norovirus za 97% (1 h) i 99% (2 h i 6 h) (Grafik 3b). Antivirusni efekat PJ na redukciju HuNoV nakon 1 h, 2 h i 6 h je manji u poređenju sa PPE što se može povezati sa nižim sadržajem dominantnih antimikrobnih komponenti. Su et al., (2010) su testirali antivirusni potencijal komercijalnog 100% PJ i polifenola nara (4,8 i 16 mg/mL) na surogate HuNoV (FV, MNV i MS2). PJ i polifenoli su postigli redukciju FCV-F9 > MNV1 > MS2, ali značajno bolja redukcija dobijena je sa polifenolima kao i u našim eksperimentima sa PPE. Interesantan podatak koji su autori (Su et al., 2010) prikazali je da PJ pri pH 7,0 ima bolju antivirusnu aktivnost nego pri pH 3,4. Naš uzorak PJ ima pH 3,3, što ukazuje na mogućnost bolje redukcije virusa pri promeni pH ka neutralnoj. Testiranjem prirodnog soka od brusnice i polifenola, antivirusni efekat na surogate HuNoV postignut je nakon 20 minuta pri čemu je postignuta maksimalna redukcija. Prilikom testiranja surogata HuNoV najrezistentniji je bio MNV. Dobijeni podaci ukazuju da se bolja redukcija postiže kada se polifenoli dodaju dodatno u sok od brusnice (Su et al., 2010). Antivirusni efekat soka od kupine, brusnice, grejpa i pomorandže je ispitan na surogatima HuNoV (MNV-1 i FCV-F9). Najbolji efekat dobijen je sa sokom od kupine > brusnica > grejp = narandža) (Oh et al., 2012). Antivirusni efekat matičnog soka od kupine se može objasniti visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja. Joshi et al., (2017) su ispitivali delovanje soka od borovnice na enterične viruse koji su nakon 24 h bili ispod granice detekcije.

Procentat rezidualne norovirusne RNK nakon tretmana sa PPE izračunat je preko formule koja je opisana u poglavlju 4.3. (Metode), a rezultati su prikazani u Grafiku 3c. U gastrointestinalnim uslovima procentat rezidualnih norovirusa nakon tretmana sa PPE (5 mg/mL) bio je 0,8% (SGF, 2 h) i 0,3% (SIF, 6 h), dok je u PBS 0,2% (2 h) i 0,06% (6 h) (Grafik 3c). Procentat rezidualnih HuNoV u PJ nakon 1 h bio je 3%, a nakon 2h i 6h iznosio je 1% (Grafik 3c).



Grafik 3c. Rezidualni procenat HuNoV u PJ i nakon tretmana sa PPE u PJ, SIF, SGF i mleku: $p < 0.05$.

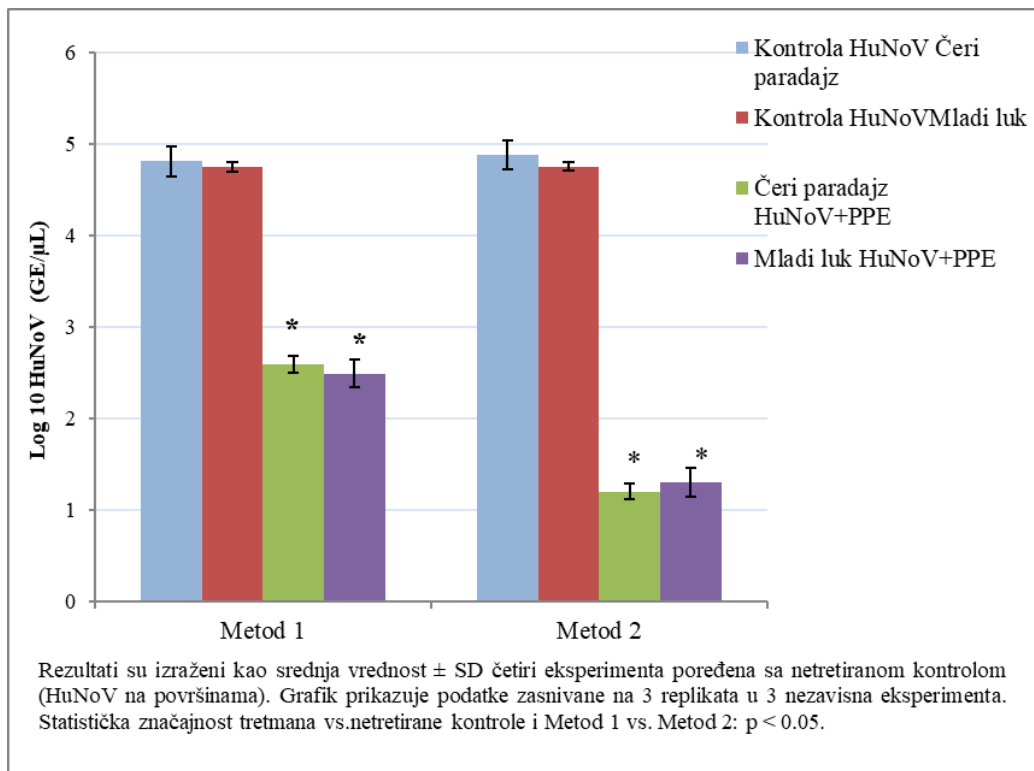
5.4.3. Redukcija humanog norovirusa na površini svežeg povrća

Sveže povrće (čeri paradajz i mladi luk) kao model hrane je odabrano jer predstavlja dominantno povrće u salatama, sendvičima, švedskom stolu ili hrani koja je spremna za konzumiranje i uobičajeno se ne dezinfikuje ili se primenjuje minimalna dezinfekcija (Radin, 2013). U Srbiji, ali i većini drugih zemalja, nije prisutna praksa da se povrće dezinfikuje različitim hemijskim sredstvima, UV svetlošću ili nekim drugim tretmanima jer se dovodi u pitanje bezbednost (López-Gálvez et al., 2019). Primena PPE kao začina ili tinkture u hrani može biti od značaja imajući u vidu njegov antimikrobni potencijal.

Prilikom izvođenja eksperimenata utvrđeno je da redukcija HuNoV na površinama svežeg povrća značajno zavisi od načina nanosa suspenzije HuNoV i PPE. Inicijalna koncentracija HuNoV ($5 \log_{10}$ GE/ μ L) služila je kao kontrola. Kada je metod 1 primenjen, rezidualne virusne čestice nakon tretmana su iznosile $2,58 \pm 0,08$ (čeri paradajz) i $2,49 \pm 0,15$ (mladi luk) \log_{10} GE/ μ L ($p < 0.05$). Bolja redukcija postignuta je primenom metode 2. Rezidualne virusne čestice nakon tretmana sa PPE su prisutne $1,18 \pm 0,06$ (čeri paradajz) i $1,30 \pm 0,12$ (mladi luk) \log_{10} GE ($p < 0,05$) (Grafik 4). Metod 2 je podrazumevao da se PPE (5 mg/mL) preventivno nanese na sterilne površine svežeg povrća i nakon toga da se izvrši kontaminacija površine sa suspenzijom HuNoV ($5 \log_{10}$ GE/ μ L). Jedan od razloga koji je upućivao da je ovakav pristup opravdan je i činjenica da virusi duže preživljavaju, što je površina povrća nepravilnija. Eksperimentima je utvrđeno da je primenom metode 1 postignuta manja redukcija, što znači da je preventivno dodavanje PPE na površine od značaja. U okviru iste metode nema statistički značajne razlike između površina i efekta PPE ($p > 0,05$). Slični rezultati publikovani su za antivirusni efekat ekstrakta semena grožđa (2 mg/mL) koji je postigao redukciju NoV GII.4 u PBS na nivou $2 \log_{10}$ GE/ μ L a u homogenizovanom ekstraktu zelene salate $1,5 \log_{10}$ GE/ μ L (Li et al., 2012). Sličan pristup imali su Falcó et al. (2018) koji su testirali antivirusnu efikasnost ekstrakta zelenog čaja (GTE) na MNV i HAV na površinama svežih jagoda i malina. Ideja autora je da se GTE inkorpora u film od alginata/oleina i da se u takvom obliku aplicira na površine svežih malina. Testiranje je vršeno na temperaturama 37°C , 25°C i 10°C . Najbolja redukcija postignuta je na 37°C za surogat MNV, $3,42 \log_{10}$ GE/ μ L (pH 7) i $5,76 \log_{10}$

GE/ μ L (pH 5,5), dok je na 25°C zabeležena manja redukcija. Redukcija za HAV je bila značajno manja 1,67 log₁₀ GE/ μ L (pH 7; 37°C) i 1,21 log₁₀ GE/ μ L (pH 5,5; 25°C). Dobijena je razlika u redukciji na zelenoj salati i spanaću, što se objašnjava različitim morfološkim karakteristikama listova. Na testu sanitacije površina, GTE (10 mg/mL) je bio efikasniji na HAV u odnosu na MNV. Surogat MNV je redukovan za 2,59 log₁₀ GE, dok je HAV bio ispod limita detekcije (> 4 log₁₀GE/ μ L).

Redukcija HuNoV na površinama svežeg čeri paradajza i mladog luka postignuta je dodatkom PPE (5 mg/mL) primenom metode 1 i 2. Rezultati izraženi preko procenata redukcije norovirusa nakon tretmana na svežem povrću, ukazuju na mogućnost redukcije norovirusa za 99% primenom PPE. Poređenjem metode 1 i 2 redukcija HuNoV se statistički značajno razlikuje (Grafik 4). Primenom metode 2 značajno je smanjena koncentracija HuNoV na površinama u odnosu na metodu 1.



Grafik 4. Rezidue HuNoV (log₁₀ GE/ μ L) na površinama svežeg voća sa PPE (5 mg/mL) primenom metode 1 i metode 2 u poređenju sa netretiranom kontrolom (HuNoV, koncentracije 5 log₁₀ GE/ μ L).

Na osnovu dobijene redukcije i antivirusnog potencijala PPE ostavlja se mogućnost daljeg testiranja i implementacije metode 2. Dalje testiranje je značajno, imajući u vidu da se sveže povrće često kontaminira neposredno pre konzumiranja. Mikrobiološka bezbednost svežeg povrća može biti značajno unapređena potencijalnom primenom prirodnog antivirusnog sredstva kao začina.

U odnosu na bakterijske patogene, virusi koji se prenose hranom su mnogo stabilniji u životnoj sredini, rezistentni na različite pH vrednosti, niske i visoke temperature (Lorenzo et al., 2018). Norovirus je vodeći virusni agens povezan sa svežim voćem i povrćem, pri čemu je najčešće kontaminirana zelena salata, mladi luk i jagodasto voće. U periodu 1998-2013 godine, od ukupanog broja alimentarnih epidemija izazvanih HuNoV i HAV, više od 40% je bilo povezano sa svežim voćem i povrćem (Callejón et al., 2015). U nešto dužem posmatranom periodu 1998-2017 godine, zabeleženi su vrlo slični rezultati da je sveže voće i povrće bilo najčešći izvor virusa (CDC, 2018).

Detekcija virusne kontaminacije na površini voća ili povrća je otežana zbog niske koncentracije virusa, matriksa biljaka i nedovoljno pristupačnih rutinskih metoda u poljoprivredi (Tian et al., 2017; Ikner et al., 2012). Međunarodna Agencija za Standardizaciju je akreditovala RT-qPCR kao standardni metod za detekciju norovirusa i HAV (Bosch et al., 2018). Međutim, detekcija HuNoV

ili HAV metodom RT-qPCR nije dostupna za većinu poljoprivrednika i malih prehrambenih proizvođača, zbog nedostatka opreme ili mikrobiološkog iskustva.

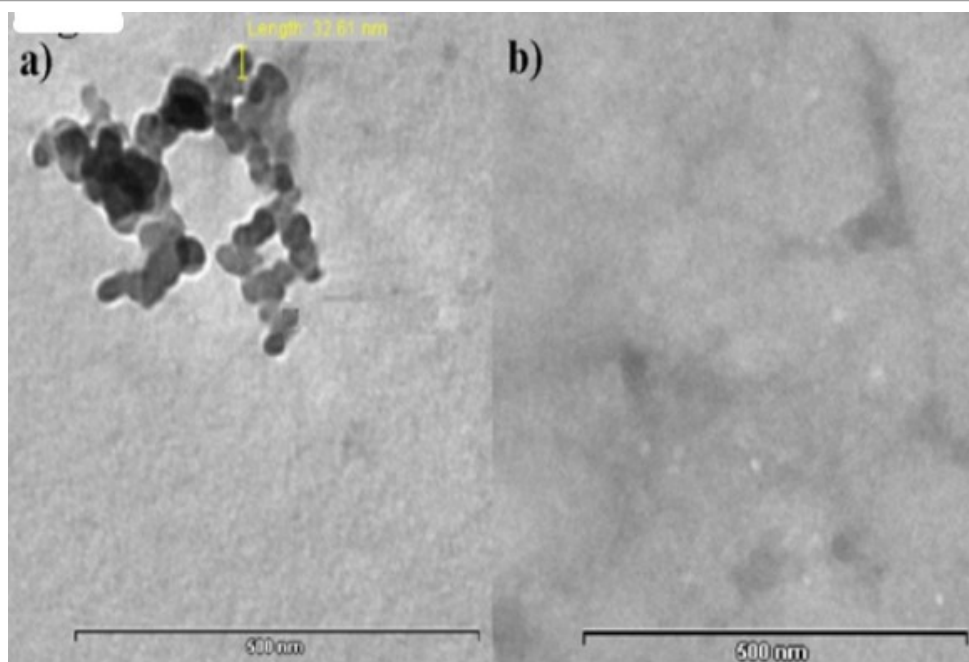
Različite studije su istraživale kontaminaciju HuNoV svežeg voća i povrća u korelaciji sa indikator mikroorganizmima. Najčešći indikator mikroorganizmi su *Escherichia coli*, ukupni kolifomi, fekalni kolifomi i adenovirusi. Kada bi postojala mogućnost detekcije indikator mikroorganizama i niskih koncentracija virusa, ovakav metod bi bio ekonomičniji, jednostavniji i brži (Tortorello, 2003). Međutim, perzistentnost HuNoV i HAV se znatno razlikuje u odnosu na bakterije. Evropski FP7 projekat VITAL (Integrirani monitoring i kontrola virusa koji se prenose hranom u lancu snabdevanja hranom u Evropi, eng. *Integrated Monitoring and Control of Foodborne Viruses in European Food Supply Chains*) je detektovao uzorke sveže salate iz supermarketa i marketa u Grčkoj, Poljskoj i Srbiji, kontaminirane HEV, HuNoV GI i GII (Kokkinos et al., 2016; Terio et al., 2017).

Svež paradajz se minimalno obrađuje (uklanjanje stabiljke-petlje, pranje, pakovanje i skladištenje) i koristi kao *ready-to-eat* proizvod. Kontaminacija HuNoV može se desiti tokom čitavog lanca proizvodnje i neposredno pre samog konzumiranja (EFSA, 2014). Epidemiološki podaci zemalja Evropske unije za period 2007-2012 ukazuju da je paradajz bio povezan sa epidemijama izazvanim bakterijom *Salmonella* i norovirusima. Norovirusi nisu uključeni u kriterijum bezbednosti hrane i uglavnom se ne vrši rutinska provera njihove prisutnosti.

Smatara se da su razlozi za porast učestalosti izbijanja epidemija povezanih sa svežim povrćem rezultat više faktora: povećana potražnja i dostupnosti ovih proizvoda, uvoz/izvoz, transport širom sveta, promene u proizvodnoj praksi i bolje metode za detekciju kontaminacije ovih proizvoda. Uočava se potreba za primenom jednostavnih metoda za dekontaminaciju virusa na površinama svežih proizvoda ili primenu sredstava koje nema štetni uticaj na zdravlje ljudi. Upravo je to bila jedna od ideja kojom se ova disertacija vodila. Na osnovu pregledane literature, reprezentativno sveže povrće (čeri paradajz i mladi luk) je odabrano za ispitivanje antivirusnog potencijala PPE. S obzirom na potvrđenu antivirusnu aktivnost PPE u ranijim istraživanjima u okviru ove disertacije, usledilo je ispitivanje na površini izabranog svežeg povrća (Živković et al., 2021).

5.4.4. Analiza čestica norovirusa transmisionom elektronskom mikroskopijom

Suspenzija HuNoV (PBS, netretirana kontrola) i HuNoV tretirana sa PPE (5 mg/mL, 1 h) analizirani su elektronskom transmisionom mikroskopijom. HuNoV iz kontrolne suspenzije i tretiran sa PPE, posmatrani su pomoću različitog uvećanja (32 000x, 42 000x i 52 000x). Prilikom posmatranja netretirane suspenzije, uočene čestice virusa imaju pravilan oblik, veličine 28-32 nm u grupi od 4-12 čestica, a na nekim mestima na mrežici su raspoređene pojedinačno (Slika 29a). Nakon tretmana sa PPE došlo je do oštećenja čestica virusa koje se nisu mogle uočiti i detektovati (Slika 29b). Izgled čestica virusa nakon tretmana se može objasniti gubljenjem karakterističnog oblika i pretpostavkom je da je došlo do razaranja kapsida i oslobađanja RNK u suspenziju. Međutim, za potvrđivanje ove pretpostavke neophodno bi bilo sprovesti dalja detaljna istraživanja mehanizma delovanja PPE. Uočene promene u morfologiji tretiranih čestica su slične promenama koje su zabeležene za NoV GII.4 posle tretmana sa GSE (Li et al., 2012) kao i za FCV i MNV tretiranih sa proantocijanima borovnice (Joshi et al., 2017). Međutim, mehanizam delovanja biljnih ekstrakta, polifenola i drugih prirodnih fitohemijskih jedinjenja na čestice virusa nije još uvek objašnjen i zahteva dalja istraživanja.



Slika 29. Analiza transmisionim elektronskim mikroskopom, 32000 x: a) humani norovirus (koncentracije $5,01 \pm 0,04$) u PBS (netretirana kontrola), b) humani norovirus nakon tretmana sa PPE (5 mg/L) (Živković et al., 2021).

5.5. Redukcija humanih norovirusa u suspenziji i na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom

5.5.1. Redukcija humanih norovirusa ekstraktom kore nara i komercijalnim dezinfekcionim sredstvima na površinama

Različiti tipovi površina koje se koriste za pripremu hrane su značajan put prenosa virusa. Perzistentnost i rezistentnost HuNoV na različita dezinfekciona sredstva potvrđena je većem broju istraživanja (Tung et al., 2013; Liu et al., 2015; Pringle et al., 2015). S obzirom da se HuNoV mogu naći u niskoj koncentraciji, metode detekcije moraju da budu osetljive i pouzdane. Nerđajući čelik i plastika su reprezentativne površine koje se često koriste kao podloga za pripremu hrane i odabrane su za testiranje antivirusne aktivnosti dezinfekcionih sredstava i PPE.

Suspenzija HuNoV (koncentracije $5 \log_{10}$ GE/ μ L) naneta je na sterilne površine koje su zatim tretirane sa PPE (5 mg/mL) sa kontaktnim vremenom od 1 h. Statistički značajna redukcija HuNoV dobijena je na obe ispitivane površine. Detektovani rezidualni norovirus je $1,75 \pm 0,01 \log_{10}$ GE/ μ L (nerđajući čelik) i $2,68 \pm 0,04 \log_{10}$ GE/ μ L (plastika) ($p < 0,05$). Na osnovu detekcije HuNoV na površinama, redukciona moć PPE (5 mg/mL) na nerđajućem čeliku iznosi $3,25 \pm 0,01 \log_{10}$ GE/ μ L i plastici $2,32 \pm 0,02 \log_{10}$ GE/ μ L nakon 1 h. Smatra se da je dobijena manja redukcija na plastici zbog bolje adhezije čestica na toj vrsti materijala. Falcó et al. (2018) su prikazali slične rezultate za ekstrakt zelenog čaja (GTE, 5 mg/mL) na nerđajućem čeliku i staklu sa kontaktnim vremenom 5 i 15 min. Redukcija sa GTE je dobijena za surogat MNV za $0,75 \log_{10}$ GE/ μ L (5 min) $1,75 \log_{10}$ GE/ μ L (15 min), dok je za HAV dobijena $0,79 \log_{10}$ GE/ μ L (5 min) i $1,92 \log_{10}$ GE/ μ L na nerđajućem čeliku. Na površini od stakla dobijena je redukcija od $1,27 \log_{10}$ GE/ μ L za HAV i $1,54 \log_{10}$ GE/ μ L za MNV nakon 15 min. Redukcija na staklu posle 5 min nije statistički značajna ($p < 0,05$). Prema zapažanju autora, rastvor GTE je pripreman 24 h neposredno pre eksperimenta, što se smatra kao faktor koji je omogućio bolju redukciju u odnosu na prethodno objavljene podatke Randazzo et al., (2017).

Antinorovirusni potencijal PPE izražen u procentima ukazuje na sposobnost redukcije 99% norovirusnih čestica na ispitivanim površinama. Dobijeni rezultati pokazuju da je postignuta bolja

redukcija HuNoV na površinama nego u suspenziji. Pretpostavka je da direktan kontakt aktivnih komponenti iz PPE sa česticama HuNoV ima značaja.

Generalno, virusi koji nemaju ovojnicu su stabilniji i rezistentiji prema mnogim dezinfekcionim sredstvima, a što pogoduje njihovom lakom i brzom prenošenju (Firquet et al., 2015). Antimikrobna sredstva koja se koriste za dezinfekciju ili sanitaciju površina moraju da budu efikasna prema širem spektru patogenih mikroorganizama. Rezidue hemijskih dezinfekcionih sredstava naročito na bazi hlora imaju štetan uticaj na zdravlje ljudi ili oštećuju površine zbog čega se teži primeni prirodnih antimikrobnih sredstava. Najnovije zahteve definisala je EPA (2019) i odnose se na koncentracije rezidua dezinfekcionih sredstava na bazi hlora koje ne smeju da prelaze više od 200 ppb, što je u skladu sa politikom FDA. Prema Codex Alimentarius-u (2012) efikasnim biocidom smatra se sredstvo koje redukuje titar infektivnih virusa $> 3 \log_{10}$. Prema EPA (2019) i Evropskom standardu za dezinfekciju (EN 14476:2015) efikasnim dezinfekcionim sredstvom se smatra sredstvo koje može da ostvari inaktivaciju virusa na površinama (nerđajući čelik, plastika, podovi, noževi i dr.) na nivou $4 \log_{10}$ GE (99,99%) pri kontaktnom vremenu koje nije duže od 60 minuta na sobnoj temperaturi.

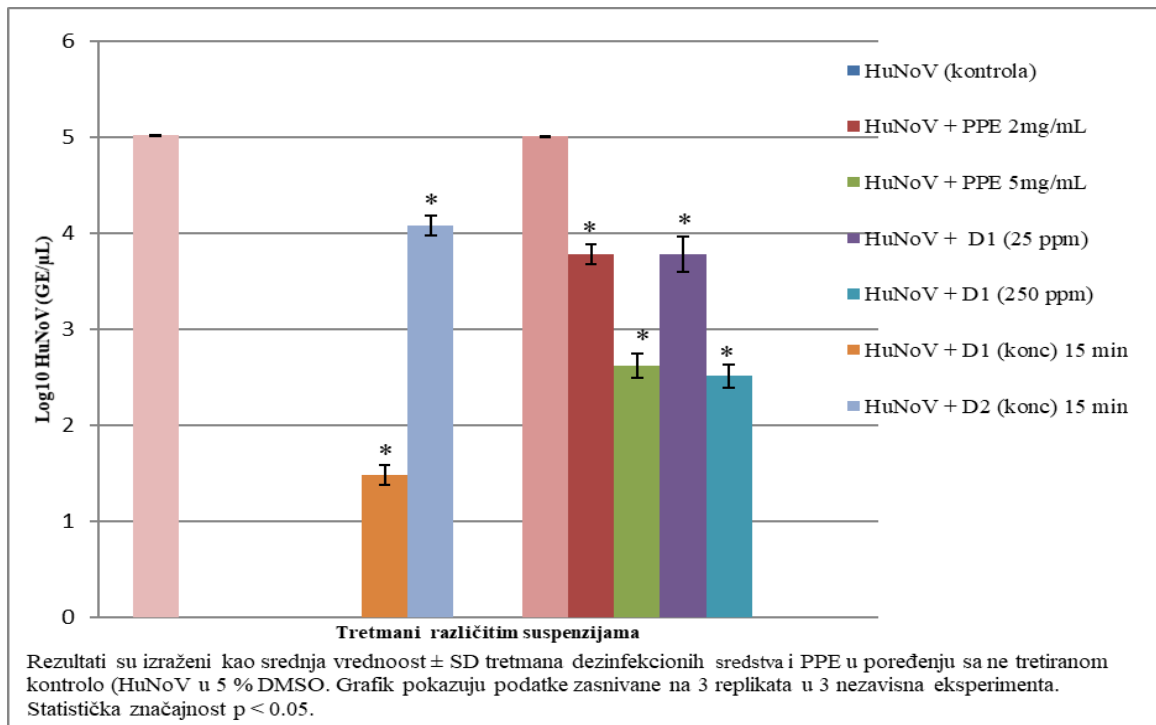
Dobro je poznato da su dezinfekciona sredstva na bazi hlora efikasna prema virusima. Deo eksperimenta je testirao efikasnost komercijalnih dezinfekcionih sredstava za redukciju HuNoV ($5 \log_{10}$ GE/ μ L) u suspenziji. Njihova efikasnost zavisi od vrste i koncentracije aktivne komponente, vremena kontakta, prisustva organskih materija i stepena nečistoće (Annous et al., 2021). U lokalnim marketima mogu se naći različita dezinfekciona sredstva na bazi hlora i sredstva koja se deklarišu kao sredstva bez slobodnog hlora, čija se antimikrobna aktivnost zasniva na drugim aktivnim komponentama.

Komercijalno sredstvo sa aktivnom komponentom na bazi hlora (D1; 4,5g NaOCl/100g) ispitano je u različitim koncentracijama: koncentrovano, razblaženo do 250 ppm i 25 ppm. Urađena je komparacija antivirusne efikasnosti dezinfekcionih sredstava sa primenom PPE u suspenziji (Grafik 5). Sa koncentrovanim D1 (4,5 g NaOCl/100g) se delovalo na HuNoV ($5 \log_{10}$ GE/ μ L) u suspenziji, nakon čega je detektovano $1,48 \log_{10}$ GE/ μ L HuNoV što znači da je njegova redukciona moć $3,52 \log_{10}$ GE/ μ L nakon 15 min. Ukoliko se rezultati iskažu u procentima rezidua norovirusa nakon tretmana sa koncentrovanim D1 (15 min) iznosi 0,048%. Rezidue norovirusa nakon tretmana sa D1 (250 ppm) iznosile su 0,6%, odnosno detektovano je $2,60 \pm 0,01 \log_{10}$ GE/ μ L u suspenziji. Takođe, ukoliko se uporedi efikasnost koncentracije od 250 ppm D1 i 5 mg/mL PPE, uočava se da je redukcija virusa bila izjednačena. Rezidue norovirusa nakon tretmana sa 2 mg/mL PPE su 8 %, odnosno detektovano je $3,78 \pm 0,02 \log_{10}$ GE/ μ L (Grafik 5). Tokom ovih eksperimenata uočeno je da je najniža koncentracija dezinfekcionog sredstva redukovala HuNoV za $0,62 \pm 0,01 \log_{10}$ GE/ μ L, slično kao neki od testiranih MBE, dok je koncentracija od 250 ppm redukovala HuNoV približno kao PPE (5 mg/mL), za $2,40 \pm 0,02 \log_{10}$ GE/ μ L. Slični rezultati su publikovani za redukciju HuNoV sa koncentracijom slobodnog hlora 33 ppm i 189 ppm. Dobijena redukcija je izosila $1,48 \log_{10}$ GE/ μ L (33 ppm) i $4,14 \log_{10}$ GE/ μ L (189 ppm), nakon 1 h. Redukcija HuNoV sa hlor dioksidom je iznosila $2,8 \log_{10}$ GE/ μ L (Kingsley et al., 2014)

Redukciju sa hlorom objavio je Montazeri et al. (2017) koji je testirao aktivnost hlor dioksida na površinama, i zabeležio redukciju NoV GI za $1,7 \pm 0,2 \log_{10}$ GE/ μ L i GII.4 za $2,4 \pm 0,2 \log_{10}$ GE/ μ L, nakon 10 min kontakta.

Komercijalno sredstvo na bazi dimetilbenzil amonijum hlorida (D2; 0,75/100g) je dezinfekciono sredstvo deklarirano kao sredstvo bez slobodnog hlora sa antimikrobnim delovanjem do 99,99 %. Dezinfekciono sredstvo D2 testirano je prema uputstvu proizvođača, koncentrovano. Antivirusna efikasnost D2 prema HuNoV u suspenziji je mala i nakon tretmana detektovano je $4,08 \log_{10}$ GE/ μ L, što znači da je redukciona moć $0,92 \log_{10}$ GE/ μ L ($p < 0,05$) u suspenziji. Sa aspekta statističke značajnosti ova redukcija je značajna u poređenju sa kontrolom, ali u skladu sa standardima koje propisuje EPA i Codex Alimentarius redukcija sa D2 dezinfekcionim sredstvom se smatra neefikasnom. Neke studije su pokazale da je dimetilbenzil amonijum hlorid efikasan prema

bakterijama: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, i plesnima: *Candida albicans* i *Aspergillus niger* (Sun et al., 2020).



Grafik 5. Rezidue norovirusa nakon tretmana sa dezinfekcionim sredstvima u poređenju sa HuNoV (netretirana kontrola, 5 % DMSO).

Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjima u kojima se detektovala slaba redukciona moć dimetilbenzil amonijum hlorida prema surogatima MS2, MNV-1 i FCV. Manju stabilnost i rezistentnost je pokazao FCV, ali redukcija od 0,83-1,15 \log_{10} GE nije zadovoljila standarde (Hoelzer et al, 2013). FDA (2016) dovodi u pitanje upotrebu dimetilbenzil amonijum hlorida sa aspekta bezbednosti po zdravlje ljudi i okoline, ali i po pitanju efikasnosti kao biocida.

5.5.2. Provera efikasnosti sanitacije površina komercijalnim dezinfekcionim sredstvima

Testiranje efikasnosti dezinfekcionih sredstava na različitim površinama izvršeno je primenom MVP ICON briseva i RT-qPCR metodom. Mešavina suspenzija HuNoV (10^6 GE/ μ L) i bakterije (10^7 ćelija/mL) primenjena je kao model mešane kontaminacije.

5.5.2.1. Detekcija HuNoV na površinama RT-qPCR metodom

Metodom brisa uzorci su uzeti sa površina od nerđajućeg čelika i plastike. Rezultati su upoređeni sa vrednostima koje su dobijene u suspenziji i uočeno je da su gubici virusnih čestica metodom brisa $1,75 \pm 0,5 \log_{10}$ GE/ μ L norovirusnih čestica, zbog čega je izvršena korekcija metode. Uzorci sa površina su uzeti metodom elucije sa 1 mL Trizol reagensa. Ovim postupkom gubici su zanemarljivi i ne odstupaju statistički značajno ($p < 0,05$) od rezultata u suspenziji. Metodom RT-qPCR omogućena je detekcija i kvantifikacija HuNoV na površinama, odnosno prikaz antivirusne efikasnosti dezinfekcionih sredstava. Antivirusna moć dezinfekcionih sredstava testirana je na dva načina:

Test 1: Sanitacija površina dezinfekcionim sredstvima (bez ispiranja)

Tretman sa D1 (250 ppm/5 min) redukovao je HuNoV za $1,52 \pm 0,3 \log_{10}$ GE/ μ L što znači da je detektovano na nerđajućem čeliku $3,48 \pm 0,3 \log_{10}$ GE/ μ L, dok je na plastici detektovano $3,87 \pm 0,3$

\log_{10} GE/ μ L virusa. Redukciona moć dezinfekcionog sredstva D1 na noroviruse nakon 5 min je $1,13 \pm 0,3 \log_{10}$ GE/ μ L. Koncentrovano sredstvo D1 (4,5 g NaOCl/100g, u kontaktnom vremenu 15 min) na površini od nerđajućeg čelika redukovao je HuNoV za $2,8 \pm 0,5 \log_{10}$ GE/ μ L. Nakon metode elucije sa površina i izolacije detektovano je $2,2 \pm 0,05 \log_{10}$ GE/ μ L. Neznatno manja redukcija u odnosu na nerđajući čelik dobijena je sa D1 (4,5 g NaOCl/100g, 15 minuta) na površini od plastike i iznosila je $2,62 \log_{10}$ GE/ μ L. Raniji testovi koji su izvedeni sa visokom koncentracijom natrijum hipohlorita (5000 ppm) ukazuju da nema značajne redukcije HuNoV GII.4 ukoliko je kontakt manji od 4 minuta (Park i Sobsey, 2011). Redukcioni potencijal dezinfekcionog sredstva D2 na bazi dimetilbenzil amonijum hlorida (0,75 g/100g) na površinama od nerđajućeg čelika je $1,1 \pm 0,5 \log_{10}$ GE/ μ L. Približna redukcija dobijena je na plastici i iznosila je $1,25 \pm 0,2 \log_{10}$ GE/ μ L HuNoV. Visoka koncentracija $3,9 \pm 0,5$ (nerđajući čelik) i $3,75 \pm 0,2$ (plastika) \log_{10} GE/ μ L HuNoV je detektovana nakon dezinfekcije sa D2 (15 minuta). Tung et al., 2013 su poredili redukciju i redukcionu potencijal hlora (250 i 1000 ppm) na HuNoV GII.2 i GII.4 sa surogatima MNV i FCV. Koncentracija hlora > 1000 ppm redukovala je $4,5 \log_{10}$ GE HuNoV, ali sa 250 ppm nije postignuta značajna redukcija HuNoV, značajna redukcija dobijena je za surogat MNV za $3 \log_{10}$ GE i FCV za $2,2 \log_{10}$ GE (Tung et al., 2013).

Test 2: Sanitacija merom ispiranja površina sterilnom vodom posle primene dezinfekcionog sredstva

Dodatna mera ispiranja površina značajno utiče na dobijanje boljih rezultata u pogledu higijene tretiranih površina. Na ovaj način mikroorganizmi se delimično fizički uklanjaju sa ciljnih površina. Nakon tretmana sa D1 (250 ppm/5 min, ispiranje) HuNoV su značajno smanjeni sa površina od nerđajućeg čelika za $2,35 \pm 0,3 \log_{10}$ GE/ μ L. Detekcija HuNoV na površini od nerđajućeg čelika izvršena je na isti način kao i bez ispiranja pri čemu je detektovano $2,65 \pm 0,3 \log_{10}$ GE/ μ L. Merom dezinfekcije sa ispiranjem dobijena je statistički značajna razlika u odnosu na testiranje bez ispiranja ($p < 0,05$). Redukcija HuNoV na plastici (ispiranje) je iznosila $2,68 \log_{10}$ GE/ μ L. HuNoV nakon sanitacije površine od plastike su detektovani u koncentraciji $2,32 \pm 0,3 \log_{10}$ GE/ μ L, manje u odnosu na nerđajući čelik. Redukcija HuNoV sa koncentrovanim D1/15 min, nakon ispiranja iznosila je $3,76 \pm 0,6 \log_{10}$ GE/ μ L (nerđajući čelik) i $3,1 \pm 0,3 \log_{10}$ GE/ μ L (plastika). Nakon ispiranja i tretmana sa D1 na površinama zaostalo je $1,24 \pm 0,6 \log_{10}$ GE/ μ L (nerđajući čelik) i $1,9 \pm 0,3$ (plastika) \log_{10} GE/ μ L. Nakon tretmana sa koncentrovanim D2 (ispiranje) dobijeno je smanjenje norovirusnih čestica za $1,88 \pm 0,2 \log_{10}$ GE/ μ L (nerđajući čelik) i $2,55 \pm 0,1 \log_{10}$ GE/ μ L (plastika). Nizak redukcionu potencijal D2 dokazan je detekcijom visoke koncentracije HuNoV na površinama $3,12 \pm 0,2$ (nerđajući čelik) i $2,45 \pm 0,1 \log_{10}$ GE/ μ L (plastika) (Tabela 9). Rezultati ukazuju da je voda fizički uticala na smanjenje broja norovirusnih čestica sa površina.

Koncentrovano D1 sredstvo je dalo najbolju redukciju, ali prilikom tretiranja nerđajućeg čelika došlo je do oštećenja materijala. Prilikom sanitacije površina pored oštećenja materijala, javlja se oštar miris nakon izvedenog postupka koji je štetan za zdravlje ljudi. Nakon tretiranja površine sa D2 i ispiranja, HuNoV je detektovan u koncentraciji od $2,45 \log_{10}$ GE/ μ L slično kao i nakon tretmana sa D1 u trajanju od 5 min. Unakrsna kontaminacija površina koje su u kontaktu sa hranom važan je aspekt bezbednosti, pogotovo u objektima u kojima se rukuje hranom.

Rezultate redukcije surogata HuNoV, saopštili su Cromeans et al. (2014), na nerđajućem čeliku sa koncentracijom hlora 1000 ppm i vremenom kontakta 5 min pri čemu je postignuta $5 \log_{10}$ redukcije za FCV. Redukcija $< 1 \log_{10}$ primenom koncentracije 200 ppm smatrana je neefikasnom. Može se reći da su dezinfekciona sredstva efikasna ukoliko je ostvarena redukcija broja čestica virusa $> 3 \log_{10}$ na čvrstim podlogama (99 %), a u suspenziji $> 4 \log_{10}$ (99,99 %) (EPA, 2019). Nedavno objavljeni rezultati ukazuju na to da je bolja redukcija HAV sa natrijum hipohloritom (200 ppm) dobijena u suspenziji nakon 5 min i za površine preporučena je koncentracija > 500 ppm duže od 10 min (Song et al., 2022). Studija koja je obuhvatila testiranje vodenog rastvora hlorne kiseline i natrijum hipohlorita na HuNoV izolovane iz uzoraka fecesa pacijenata sa gastrointestinalnom infekcijom ukazuje na inaktivaciju HuNoV GII.4 i GII.2 preko 90% nakon 30 minuta. U odsustvu

organskih supstanci vodeni rastvor hlorne kiseline (200 ppm) nakon 5 minuta obezbedio je redukciju $> 3 \log_{10}$ GE HuNoV (Goda et al., 2022).

Tabela 9. Detekcija humanih norovirusa na površinama od nerđajućeg čelika i plastike nakon tretmana dezinfekcionim sredstvima metodom RT-qPCR

Uzorci		Detekcija HuNoV na površinama (\log_{10} GE/ μ L)					
		Metal			Plastika		
		†Tretman					
	Koncentracija	Sredstvo	Vreme	Bez ispiranja	Ispiranje	Bez ispiranja	Ispiranje
HuNoV ^a	10^5		15 min	$5 \pm 0,05$	-	$5 \pm 0,05$	-
HuNoV + <i>E.coli</i> ^b	$10^6 + 10^7$		15 min	$5 \pm 0,08$	-	$5 \pm 0,03$	-
	250 ppm	D1 ^c	5 min	$3,48 \pm 0,3$	$2,65 \pm 0,1$	$3,87 \pm 0,3$	$2,68 \pm 0,2$
	4,5g /100g	D1 ^c	15min	$2,2 \pm 0,5$	$1,24 \pm 0,6$	$2,38 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,3$
	0,75g/100g	D2 ^c	15min	$3,9 \pm 0,2$	$3,12 \pm 0,2$	$3,75 \pm 0,9$	$2,45 \pm 0,1$
		Vlažne maramice ^d		$2,68 \pm 0,3$	-	$3,1 \pm 0,2$	-
Negativna kontrola*				ND	ND	ND	ND

† Rezultati su dobijeni metodom RT-qPCR na instrumentu Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, metodom elucije sa Trizol reagensom. Površine su tretirane dezinfekcionim sredstvima i nakon sušenja testirane ili prethodno podvrgnute ispiranjem miliQ vodom, pa testirane.

- Suspenzija HuNoV u fiziološkom rastvoru ($5 \log_{10}$ GE/ μ L HuNoV) naneta na odabrane površine služila je kao netretirana kontrola;
- Smeša suspenzija HuNoV (koncentracija $6 \log_{10}$ virusnih GE/ μ L) sa suspenzijom *E.coli* (10^7 ćelija/mL) – služila je kao netretirana kontrola i koristila se za ispitivanje dezinfekcionog potencijala komercijalnih sredstava;
- Tretman smeša suspenzija bakterije i virusa sa D1 (250 ppm), D1 (koncentrovano) i D2 (koncentrovano);
- Smeša suspenzije HuNoV i *E.coli* dezinfikovanje površine komercijalnim antibakterijskim vlažnim maramicama

* Negativna kontrola – bris sa sterilne površine i površine na kojoj je nanet fiziološki rastvor; ND – nije detektovano.

5.5.2.2. Detekcija adenzin trifosfata (ATP)

Prilikom manipulacije hranom obavezna mera bezbednosti je verifikacija čišćenja i sanitacije površina koje dolaze u kontakt sa hranom. Adenzin tri fosfat (ATP) se nalazi u živim ćelijama ali i u ostacima hrane i mikroorganizmima. Detekcija ATP molekula se smatra dobrim indikatorom za proveru pravilno izvedenog postupka sanitacije, odnosno da li je higijena na odgovarajućem nivou (Whiteley et al., 2016). Metod *Lightning MVP ICON*[®] je deo HACCP sistema za praćenje indikatora kvaliteta higijene površina, ruku ili tečnosti.

Testirana je efikasnost detekcije mešavine suspenzija bakterije *E. coli* i HuNoV pomoću ATP metode brisa na površinama od nerđajućeg čelika i plastike. Za izvođenje eksperimenta korišćena je suspenzija koliformne bakterije *Escherichia coli*, koja je jedan od indikatora higijene procesa, kriterijum higijene i bezbednosti hrane (Pravilnik o uslovima higijene hrane, 73/10). Gustina

bakterijske suspenzije određena je standardnom metodom na McFarlandu aparatu i odgovarala je broju 10^9 cfu/mL. Za izvođenje eksperimenta pripremljena su decimalna razređenja u fiziološkom rastvoru (1:9). Suspenzije bakterija (koncentracije 10^7 cfu/mL) i HuNoV (koncentracije 10^6 GE/ μ L) su pomešane u jednakom zapreminskom odnosu. Nakon sušenja, uzeti su brisevi sa površina i očitavanje je izvršeno na MVP ICON uređaju. Suspenzije bakterije u različitim koncentracijama uzete su specijalnim brisevima *Lightning* MVP ICON® i detektovana je značajna koncentracija ATP-a na površinama, čije vrednosti odgovaraju zoni prljavog > 2,5. Najviša koncentracija *E.coli* (10^7 ćelija/mL) očitana je u izuzetno visokoj vrednosti 4,8 na nerđajućem čeliku i 4,7 na plastici (Tabela 10). Mešavinu suspenzija bakterije i virusa *Lightning* MVP ICON® je detektovao kao prisutnost bioloških molekula na površinama u zoni prljavog > 3,5. Brisevi su uzeti i sa čistih površina nerđajućeg čelika i plastike (negativna kontrola) i površina nerđajućeg čelika i plastike koje su dezinfikovane vlažnim maramicama (tretmani).

Antivirusna moć dezinfekcionih sredstava testirana je na dva načina:

Test 1: Tretiranje površina dezinfekcionim sredstvima bez ispiranja

Nakon sanitacije bez ispiranja sa D1 (250 ppm, 5 min), D1 (koncentrovan, 4,5g/100g NaOCl, 15 min) i D2 (0,75g/100g dimetilbenzil hlorida) kontaminacija mešavinom HuNoV i *E.coli* nije uklonjena već je identifikovana u zoni upozorenja i zoni prljavog. Uređaj MVP ICON je detektovao vrednosti za nerđajući čelik u zonama: D1 (250 ppm) - 2,5; D1 (koncentrovan) - 2,7; D2 (koncentrovan) - 2,8. Na površinama od plastike, nakon sanitacije bez ispiranja vrednosti su bile u zoni prljavog (FAIL): D1 (250 ppm) - 3,3 i D2 (koncentrovan) - 3,0. Koncentrovano sredstvo D1 je bilo na granici čistog i prljavog, odnosno zona upozorenja (WARN) - 2,5. Nakon tretmana sa dezinfekcionim sredstvima na površini od plastike primećena je značajna prisutnost ATP molekula i razlika u odnosu na nerđajući čelik, što se može pripisati boljoj adheziji čestica, ćelija i drugih bioloških molekula, ali i mehaničkom oštećenju i nesavršenosti plastike u odnosu na glatke površine (Tabela 9).

Test 2: Tretiranje površina dezinfekcionim sredstvima i ispiranje sterilnom miliQ vodom

Nakon sanitacije i ispiranja površina od nerđajućeg čelika sa sredstvima D1 i D2, ATP nije detektovan na površinama, odnosno dobijeni rezultati su u zoni čistog (Tabela 10). Rezultati za negativne kontrole bili su u zoni čistog, ATP nije prisutan na površinama. Na površinama plastike koje su tretirane sa dezinfekcionim sredstvom D1 i nakon toga isprane, detektovana je određena količina ATP koja je na granici zone čistog i upozorenja. Tretmani površina sa dezinfekcionim sredstvom D2 nakon ispiranja su dali zadovoljavajuće rezultate, odnosno obeležene površine su detektovane u čistoj zoni. Ispiranje može dovesti do unakrsne kontaminacije drugih površina ukoliko patogeni mikroorganizmi nisu inaktivisani.

Detekcija u zoni čistog ukazuje da može doći do lažno negativnih rezultata kada je u pitanju prisustvo virusa. Kontaminacija virusima nije otklonjena na šta ukazuju i rezultati detekcije HuNoV dobijeni sa RT-qPCR na istim površinama u koncentracijama koje mogu izazvati oboljenje (Tabela 9). Primena ATP bioluminiscentnog testa nije specifična metoda i zasniva se na enzimskoj reakciji i na rezultat mogu uticati primenjena dezinfekciona sredstva. Detekcija prisutnosti živog organizma, koji često može biti patogen, na površinama ukazuje na nedovoljnu ili neuspešnu sanitaciju. Prilikom testiranja potencijala ATP bioluminiscentne metode u detekciji mikrobnе kontaminacije kućnih frižidera, rezultati su poređeni sa standardnom metodom brisa i metodom agarnih ploča. S obzirom da su registrovana mala odstupanja između dobijenih rezultata, zaključak je bio da je ATP test pogodan za terensku procenu mikrobiološke kontaminacije frižidera (Chen i Godwin, 2006).

U ovom kontekstu primena bioluminiscentnog ATP testa je korisna jer može brzo da se izvrši revizija tehnika koje se koriste za postizanje uspešne dezinfekcije. Brojne studije su sprovedene kako bi se potvrdio potencijal primene ATP metode u proceni bezbednosti hrane u celom lancu proizvodnje. Rezultati su dizajnirani da pruže povratnu informaciju o sanitaciji, umesto kvantifikacije biološkog materijala (Cunningham et al., 2011; Osimani et al., 2014; Lane et al.,

2020). Whitehead et. al., (2008) su potvrdili da je ATP uređaj koristan za pregled sanitacije i dezinfekcije teško dostupnih površina za čišćenje. Dezinfekciona sredstva mogu da imaju uticaj na smanjenje efikasnosti luciferaze ili da deluju kao agensi koji oslobađaju ATP (Brown et al., 2010).

Tabela 10. Provera efikasnosti komercijalnih dezinfekcionih sredstava metodom Lightning MVP ICON, detekcijom ATP molekula kao indikatora higijene

Uzorci		Površine				
		Nerdajući čelik		Plastika		
		Tretman [†]				
Koncentracija		Bez Ispiranja H ₂ O	Ispiranje H ₂ O	Bez Ispiranja H ₂ O	Ispiranje H ₂ O	
Negativna kontrola*		1,3	-	1,2	-	
	10 ⁵	2,7	-	3,3	-	
<i>E.coli</i> ^a	10 ⁶	3,35	-	4,0	-	
	10 ⁷	4,4	-	4,7	-	
HuNoV ^b	10 ⁵	1,5	-	1,6	-	
	10 ⁶	1,9	-	1,7	-	
HuNov+ <i>E.coli</i> ^c	10 ⁶ +10 ⁷	D1 (250 ppm ^d)	2,5	-	2,7	-
		D1 (4,5 g NaOCl/100 g)	2,3	2,1	2,5	1,9
		D2 (0,75g/100g) dimetilbenzil amonijum hlorid	2,7	1,5	3,0	1,7
		Komercijalne maramice hlorheksidin diglukonat (4%)	3,23		3,55	

[†] Rezultati su dobijeni pomoću instrumenta MVP ICON i izražavaju u zonama koje su ekvivalentne relativnim jedinicama svetlosti (RLU). Zona čistog < 2,5 (pass, zelena boja); upozorenje 2,5-3 (warn, re-test, narandžasta boja) - preporuka je da se uradi ponovna sanitacija dok vrednosti ne budu ispod 2, jer je veća sigurnost da je površina čista. Odnosno da nema prisutnog ATP-a; > 3 (fail, crvena boja)

* negativna kontrola – bris sa sterilne površine i površine na kojoj je nanet fiziološki rastvor;

– nije rađeno.

a) Suspenzija *Escherichia coli* (10⁵, 10⁶, 10⁷ ćelija/mL);

b) Suspenzija HuNoV u fiziološkom rastvoru (5 i 6 log₁₀ GE/μL HuNoV);

c) Smeša suspenzija HuNoV (koncentracija 6 log₁₀ virusnih GE/μL) sa suspenzijom *E.coli* (10⁷ ćelija/mL) – koristi se za ispitivanje dezinfekcionog potencijala komercijalnih sredstava;

d) Tretman smeša suspenzija sa D1 (200 ppm), D1 (koncentrovano, 4,5 g NaOCl/100 g proizvoda; < 5 % neanijonskih surfakanata), D2 (0,75 g /100 g proizvoda; < 5 % neanijonskih surfakanata);

5.6. Efikasnost dezinfekcionih sredstava na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom

Dezinfekciona sredstva koja su primenjena u ovim eksperimentima nisu imala uticaj na rezultat ATP metode, što je potvrđeno RT-qPCR metodom i detekcijom prisustva biološkog materijala (mešavina suspenzije HuNoV i *E.coli*). Međutim, slična istraživanja su se bavila ispitivanjem uticaja različitih koncentracija dezinfekcionog sredstva na merenje ATP. Koncentrovana dezinfekciona sredstva imaju uticaj na narušavanje ćelijske strukture mikroorganizama, oslobađaju ATP i daju lažno pozitivne rezultate, što je dodatno potvrđeno sa RT-qPCR (Turner et al., 2010). Detekcija ATP molekula je u okviru HACCP sistema i ukazuje na prisustvo različitih rezidua biološkog porekla ili mikroorganizama. Virusi se replikuju u živom ćelijama domaćina, ali kako se prenose fekalno-oralnim putem, pretpostavka je da se nalaze inkorporirani u biološkom materijalu. Različite koncentracije suspenzije HuNoV u fiziološkom rastvoru služile su kao kontrola i potvrda da se virusi ne mogu detekovati metodom ATP brisa, a njihovo prisustvo je potvrđeno RT-qPCR metodom. Suspenzija *Esheria coli*, koliformna bakterija služila je kao pozitivna kontrola i potvrda detekcije ATP molekula na odabranim površinama. *E.coli* je odabrana u odnosu na druge indikatore fekalnog zagađenja, jer je najviše bila povezana u mešanim kontaminacijama sa HAV i HuNoV (Kotwal i Cannon, 2014; Greaves et al., 2020).

Nerđajući čelik koji nije porozan se preporučuje kao najbolji materijal za primenu u proizvodnji hrane, čime je omogućena vizuelna detekcija nečistoća, bolja sanitacija i dezinfekcija (Ramírez-Castillo et al., 2015). Viator et al. (2017) su testirali ATP uređaj i utvrdili da je kompatibilan sa drugim uređajima kada se koristi na nerđajućem čeliku. Razlika koja je primećena prilikom vizuelne detekcije površine od plastike je što se teže uočava kontaminacija sa navedenim suspenzijama što može dovesti do varijacije u rezultatima. Kontaminirane površine zauzimaju važno mesto u izazivanju epidemija HuNoV (Wu et al., 2005; Nenonen et al., 2014).

Pored navedenog, testirane su i antibakterijske maramice sa aktivnom komponentom hlorheksidin diglukonat (4%) koje su redukovale HuNoV sa površina od nerđajućeg čelika za $2,32 \log_{10}$ GE/ μ L i sa plastike $1,90 \log_{10}$ GE/ μ L. Detekcija HuNoV izvršena je RT-qPCR metodom, pri čemu je detektovano $2,68 \pm 0,3$ (nerđajući čelik) i $3,1 \pm 0,2 \log_{10}$ GE/ μ L (plastika) ($p < 0,05$), dok je ATP metodom potvrđena prisutnost biološkog materijala u zoni prljavog (Tablela 9 i 10). Iako eksperimentima nije potvrđeno, smatra se da je dobijena redukcija mehanička i da su virusi zadržani na materijalu vlažnih maramica. Hlorheksidin diglukonat je jedinjenje koje se koristi za antibakterijsku dezinfekciju ruku, odnosno kože i odobren je od strane Evropske Norme EN1499:2013 (Eggers et al., 2018). Eksperimenti koji su izvedeni sa tečnošću za dezinfekciju na bazi hlorheksidin diglukonat (4 %), sastojali su se od veštačke kontaminacije ruku sa *E.coli* i surogatom norovirusa MNV i dezinfekcije sa hlorcikloheksidin diglugonatom u trajanju od 60 s. Hlorheksidin diglukonat je redukovao *E.coli* prema zahtevima EN1499:2013, dok na MNV nije imao uticaj (Eggers et al., 2018). Smatra se da će sredstva koja su efikasna prema virusima bez ovojnice biti efikasna prema virusima sa ovojnicom kao što su ebola, koronavirus i influenza (Eggers et al., 2015a; 2015b). Boxman et al. (2009) su dokazali da nakon izbijanja epidemije HuNoV, može da se detektuje na jednoj ili više površina (kuhinje, restorana, sobe za presvlačenje radnika). Nakon epidemije izazvane kontaminiranim kateringom oko 40% od ukupnog broja briseva sa površina bilo je pozitivno na HuNoV iz kupatila i kuhinje (Boxman et al., 2011).

Benefiti primene vlažnih maramica su pre svega u mehaničkom ukljanjanju nečistoća sa površina i brzoj dezinfekciji. Prilikom mehaničkog ukljanjanja mora se uzeti u obzir materijal maramica, pritisak, broj i način pokreta, sposobnost adhezije mikroorganizama ali i aktivna komponenta (Williams et al., 2007; Song et al., 2019). Iako su dostupne i jednostavne za upotrebu, podaci ukazuju na neuspešnost dezinfekcije i mogućnost unakrsne kontaminacije, prenosa mikroorganizma na druge površine (Song et al., 2019). Jedna od studija koja se bavila dezinfekcijom primenom vlažnih maramica ukazuje da mogu smanjiti transmisiju rinovirusa i rotavirusa u domaćinstvima, a time i smanjiti verovatnoće zaraze (Tamimi et al., 2015). Koristeći modele rinovirusa i rotavirusa utvrđeno je da se rizik od infekcije može smanjiti za 30-89%, u zavisnosti od koncentracije i imuniteta osobe. Mori et al. (2007) su testirali efikasnost ukljanjanja surogata norovirusa FCV sa površina ruku i ostvarili uspešnu redukciju koristeći vlažne maramice sa aktivnom komponentom

hlorheksidin, kvaternarnim amonijumovim jedinjenjima i benzoevom kiselinom. Za testiranje komercijalnih vlažnih maramica sprovedena je studija u skladu sa EN 16615:2015 (Becker et al., 2019). Vlažne naramice na bazi sirćetne kiseline su redukovale tri testirana virusa (adenovirusi, MNV i poliomavirusi), sa izopropanolom nije postignuta dovoljna redukcija propisana standardom, dok kvaternarna amonijumova jedinjenja nisu uspela da ih redukuju.

Lopez et al. (2014) su testirali dezinfekcioni potencijal vlažnih maramica na bazi aktivne komponente dimetil benzil amonijum hlorida na površinama laminata, mermera, i keramike. Površine su kontaminirane suspenzijama *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis* spora i poliovirusa 1 i nakon sušenja izvršena je dezinfekcija vlažnim maramicama. Dobijena je redukcija od 3,4 - 5 log₁₀ GE, dok su spore *B. thuringiensis* rezistentnije i redukovane su na nivou 2,5 log₁₀ GE. Ovo je u skladu sa studijama Berendt et al. (2011) i Panousi et al. (2009) koje potvrđuju da dezinfekcione maramice smanjuju mikrobiološku kontaminaciju na različitim površinama.

Vrlo malo istraživanja se bavilo prenosom mikroorganizma na ruke nakon dezinfekcije vlažnim maramicama. Podaci su ukazali na manju unakrsnu kontaminaciju ruku i površina, nakon dezinfekcije. Transmisija zavisi od materijala i koncentracije mikroorganizma. Okada et al. (2016) su ispitivali higijenu ruku, poredeći dezinfekciju sa vlažnim maramicama u odnosu na klasičanu primenu sapuna i vode. Ono što treba istaći je da je stepen dekontaminacije bio veći kada se primenjuje tradicionalno pranje ruku vodom i sapunom. Vlažne antibakterijske maramice uklanjaju nečistoće mehaničkim putem, odnosno većina dostupnih komercijalnih dezinfekcionih maramicu ne sadrži dovoljnu koncentraciju hemijskog sredstva koje bi potpuno inaktivisalo patogene mikroorganizme zbog čega neretko dolazi do prenosa i na druge površine (Istenes et al., 2013).

5.7. Detekcija virusnog kapsida primenom FLASH® Alergen Indikator Protein testa

Detekcija virusnog kapsida korišćenjem FLASH® Alergen Indikator Protein testa (BioControl Systems, SAD) predstavlja pokušaj prilagođavanja i primenu metode za aproksimativnu i informativnu detekciju virusa na površinama. FLASH® test je dizajniran da može brzo da detektuje proteinske rezidue na površinama koje dolaze u kontakt sa hranom nakon sanitacije (BioControl Systems, 2017). Koncept ovog dela eksperimenta se sastojao od veštačke kontaminacije, tj. nanosa 100 µL norovirusne suspenzije (koncentracija 10⁶, 10⁵, 10⁴ i 10³ GE/µL) na sterilne površine koje dolaze u kontakt sa hranom (nerđajući čelik, 10 x 10 cm). Eksperimenti su izvedeni u sterilnim uslovima radi sprečavanja dobijanja lažno pozitivnih ili negativnih rezultata. Uzorci sa čistih i sterilnih površina nerđajućeg čelika služili su kao negativna kontrola. Ovaj test omogućava laku i jednostavnu vizuelnu detekciju, jer se pozitivnom reakcijom smatra promena boje tečnosti u koju je uronjen bris koji se koristi za uzorkovanje i detekciju proteina. Za detekciju proteina čija je koncentracija manja od 3 µg, senzitivnost se povećava inkubacijom briseva 10 min na 70°C.

Ukoliko su prisutni proteini na površinama detekcija se manifestuje promenom boje tečnosti u kojoj se brisevi nalaze, od zelene do tamno ljubičaste (zelena - proteini nisu prisutni; siva - zona upozorenja; od svetlo do tamno ljubičaste - proteini su prisutni). Inkubacija briseva se vršila na 25°C/10 min na kojoj niže koncentracije HuNoV čestica (10³, 10⁴ i 10⁵ GE/µL) nisu izazvale reakciju, odnosno boja indikator tečnosti u koju je uronjen bris je ostala nepromenjena - zelena. Tamno ljubičasta boja dobijena je za suspenziju HuNoV koncentracije 10⁶ GE/µL. Kada su uzorci briseva inkubirani na 70°C/10 min, sve koncentracije HuNoV su izazvale promenu boje testa, od svetlo (za koncentracije 10⁵, 10⁴ i 10³ GE/µL) do tamno ljubičaste boje (za koncentraciju 10⁶ GE/µL) (Slika 28). Negativne kontrole su detektovane zeleno, odnosno proteini nisu prisutni.



Slika 28. Detekcija kapsida primenom FLASH® Alergen Indikator Protein test

FLASH® proteinski brisevi su pokazali potencijalno laku i brzu detekciju proteinskih komponenti, u našem eksperimentu norovirusnih čestica na nerđajućem čeliku kao površini koja je najčešće u kontaktu sa hranom. Ovi rezultati ukazuju da bi proteinski brisevi mogli da se koriste preventivno za proveru higijene površina, koja nije ograničena na alergene (BioControl Systems, 2017). Neki od protokola dekontaminacije, temperatura, nizak pH, dezinfekciona sredstva mogu ostaviti neoštećen kapsid norovirusne čestice, što može dovesti do lažne interpretacije rizika. Primena brzog alergen protein testa je značajna jer ukazuje na različito prisustvo proteinskih rezidua u zavisnosti od koncentracije virusa. Dobijeni rezultati su potvrđeni RT-qPCR metodom. Pozitivan test na prisustvo proteinskih rezidua (bilo koje prirode) prema HACCP protokolu ukazao bi na potrebu da se ponovi sanitacija (Sun i Ockerman, 2005). Dalja istraživanja su se nalazila izvan okvira i ciljeva definisanih u ovoj disertaciji.

5.8. Detekcija humanih norovirusa primenom različitih komercijalnih kitova

Različite vrste hrane, biljnog ili životinjskog porekla, mogu sadržati značajne koncentracije inhibitornih supstanci koje mogu uticati na dobijanje lažno negativnih ili neujednačenih rezultata (Lloyd et al., 2010). Tokom različitih eksperimenata koristila se RT-qPCR metoda sa predhodnom optimizacijom različitih metoda izolacije virusne RNK u cilju dobijanja pouzdanih i ponovljivih rezultata. Prilikom izvođenja izolacije norovirusne RNK koristili su se različiti komercijalno dostupni setovi reagenasa, čija je upotreba imala za cilj upoređivanje i odabir metode sa kojom će se dobiti najbolji rezultat i ponovljivost. Značajno je napomenuti da dobijena varijabilnost između istih grupa uzoraka nije statistički značajna.

Poređenjem metoda Trizol, fenol/hloroform i RNeasy mini kitova za ekstrakciju virusne RNK, Xiang et al. (2001) nisu dobili značajne razlike u detekciji i interpretaciji rezultata, što je u skladu sa našim rezultatima. Međutim, uočeno je da su rezultati koji su dobijeni korišćenjem Ribo-Sorb kita u odnosu na NucleoSpin® RNA Virus/RNA Virus F kita bili znatno bolji. U našim istraživanjima, složeni matriks mleka (visok sadržaj proteina, ugljenih hidrata i mlečne masti) imao je značajan uticaj na uspešnost metode izolacije virusne RNK i kit Ribo Sorb se nije pokazao kao adekvatan za ovaj tip eksperimenta. Jedno od objašnjenja je moguća potencijalna interakcija sorbenta sa česticama mleka. To je bio razlog da se pristupi optimizaciji izolacije norovirusne RNK kako bi se obezbedili ponovljivi i validni rezultati. Slično istraživanju Hennechart-Collette et al. (2017)

dodatak proteinaze K u uzorke mleka pre početka izolacije nukleinske kiseline nije imao uticaj na poboljšanje metode.

Međutim, Trizol™ Direct metod kao brz metod izolacije dao je zadovoljavajuće rezultate za ovaj tip eksperimenata. I za druge matrikse hrane kao što su površine svežeg povrća, ali i za površine koje dolaze u kontakt sa hranom, korišćen je metod koji se zasnivao se na Trizol™ reagensu za izolaciju norovirusne RNK. U našim eksperimentima izolacija norovirusne RNK se, pored Trizol, zasnivala i na fenol/hloroform reagensima. Prednost fenol/hloroform izolacije potvrđena je istraživanjima Fanson et al. (2000) u kojima je komercijalni RNK ekstrakcioni kit, u poređenju sa nevedenom metodom, pokazao manju senzitivnost. U okviru ove disertacije, primenjena metoda se pokazala kao pouzdana za izolaciju nukleinske kiseline sa različitih površina, bez obzira na metod uzorkovanja (sakupljanja) norovirusa (brisevima ili elucijom).

6. ZAKLJUČAK

Virusi koji se prenose hranom su vodeći etiološki agens nebakterijskog gastroenteritisa. Generalno, virusi su oduvek bili veoma interesantna grupa patogena, pre svega zbog svoje građe, mutacija, perzistentnosti i niskih infektivnih doza. U odsustvu vakcine i efikasne kontrole koja će sprečiti prenošenje humanih norovirusa hranom i površinama koje dolaze u kontakt sa hranom, otvara se značajno polje istraživanja antivirusnog potencijala prirodnih biljnih ekstrakata. Biljni ekstrakti su bogati polifenolima i poznati su po zdravstvenim benefitima. U ovoj disertaciji ispitivan je ekstrakt kore ploda nara, koji se među drugim ispitivanim ekstraktima lekovitog bilja, izdvojio prema izraženom antivirusnom potencijalu u minimalnim koncentracijama. Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. U suspenziji humanih norovirusa, pripremljenoj iz fecesa dece obolele od akutnog nebakterijskog gastroenteritisa, apsolutnom kvantifikacijom određena je njihova koncentracija koja je iznosila $6 \log_{10}$ GE/ μ L.
2. Antinorovirusni potencijal 11 ekstrakata medicinskih biljaka testiran je u minimalnim koncentracijama (0,2; 1,0; 2,5 mg/mL). Redukcija humanih norovirusa u intervalu od 0,5 - $1 \log_{10}$ GE/ μ L dobijena je sa ekstraktima *Aronia melanocarpa* (aronija), *Hypericum perforatum* (kantaron), *Punica granatum* L. (nar - kora ploda) i uparenog vina Prokupac. Redukcija humanih norovirusa sa navedenim biljnim ekstraktima slična je redukciji koja je ostvarena niskim koncentracijama dezinfekcionih sredstava na bazi hipohlorita.
3. Ekstrakt kore nara je analiziran različitim metodama pri čemu je utvrđeno da je bogat različitim polifenolnim jedinjenjima. Ukupan sadržaj fenola u ekstraktu kore iznosio je 320,16 mg GAE/g i ukupan sadržaj tanina iznosio je $17,37 \pm 0,64$ %. Dominantne biološki aktivne komponente su detektovane u visokoj koncentraciji: punikalin 197,13 mg/g, punikalagin 54 mg/g, elagna kiselina $25,42 \pm 0,80$ mg/g i galna kiselina $6,83 \pm 0,53$ mg/g.
4. Komercijalni matični sok od nara deklarisan kao 100% prirodni analiziran je sličnim metodama kao ekstrakt kore nara. U matičnom soku nara ukupan sadržaj fenola iznosio je $146 \pm 2,01$ mg GAE/100 mL soka i ukupan sadržaj tanina $5,21 \pm 0,22$ %. Primećena je značajno niža koncentracija punikalina 86,93 mg/g, punikalagina 43,23 mg/g i elagna kiseline $6,49 \pm 0,71$ mg/g u odnosu na ekstrakt kore nara, dok se koncentracija galne kiseline $6,69 \pm 0,33$ mg/g, nije statistički značajno razlikovala ($p < 0,05$). Biološki aktivna jedinjenja iz matičnog soka nara detektovana su u statistički značajno nižoj koncentraciji u odnosu na ekstrakt kore ($p < 0,05$).
5. Antivirusna efikasnost ekstrakta kore nara u suspenziji ispitana je u koncentracijama 2 mg/mL i 5 mg/mL na temperaturama 25°C i 37°C. U okviru testiranja istih koncentracija, nije zabeležena statistički značajna razlika antivirusnog delovanja ekstrakta ($p < 0,05$) narazličitim temperaturama.
6. Ekstrakt kore nara (5 mg/mL) u suspenziji redukovao je humane noroviruse (inicijalne koncentracije $5 \log_{10}$ GE/ μ L) za $2,41 \log_{10}$ GE/ μ L nakon 1 h. Najveću antinorovirusnu aktivnost u suspenziji, ekstrakt kore nara postigao je nakon 6 h redukujući humane noroviruse za $3,38 \log_{10}$ GE/ μ L ($p < 0,05$).
7. Perzistentnost humanih norovirusa ispitana je u fosfatnom puferu (pH 7,2), mleku sa niskim sadržajem mlečne masti (pH 6,8), simuliranim gastričnim (pH 1,2) i intestinalnim (7,5) uslovima. Navedeni rastvori nisu uticali na redukciju humanih norovirusa.

8. Dodatak ekstrakta kore nara (5 mg/mL) u fosfatni pufer, mleko sa niskim sadržajem mlečne masti, simuliranim gastričnim i intestinalnim fluidima pokazao je značajan antivirusni efekat. Redukcija humanih norovirusa za 99% postignuta je sa ekstraktom kore nara u fosfatnom puferu (vreme inkubacije 2 h i 6 h), simuliranim gastričnim (2 h) i intestinalnim (6 h) uslovima.
9. U mleku, modelu hrane kompleksnog hemijskog sastava, ekstrakt kore nara je redukovao humane noroviruse za 91%. Eksperimenti sugerišu potencijalnu primenu ekstrakta kore nara kao prirodnog antivirusnog sredstva u kontroli kontaminacije hrane. Matični sok od nara (pH 3,3) ispoljio je sposobnost redukcije humanih norovirusa za 97%. Ovi rezultati ukazuju na značaj konzumiranja soka za održavanje normalne funkcije organizma.
10. Sposobnost ekstrakta kore nara da redukuje humane noroviruse na površinama svežeg čeri paradajza i mladog luka za 99% je od velikog značaja jer se ovi proizvodi najčešće koriste sveži bez termičkog tretmana. Utvrđeno je da način aplikacije ekstrakta kore nara na površinama povrća statistički značajno utiče na redukciju humanih norovirusa na površinama. Kada je prvo aplikovan ekstrakt pa virus, rezidualne čestice virusa detektovane su u koncentraciji 1,18 log₁₀ GE/μL (čeri paradajz) i 1,30 log₁₀ GE/μL (mladi luk), dok je broj rezidualnih virusnih čestica na istim površinama iznosio 2,58 log₁₀ GE/μL (čeri paradajz) i 2,49 log₁₀ GE/μL (mladi luk) kada je prvo aplikovan virus, a zatim ekstrakt.
11. Antivirusni potencijal ekstrakta kore nara kao prirodnog dezinfekcionog sredstva na površinama od nerđajućeg čelika i plastike je značajan. Postignuta redukcija humanog norovirusa u suspenziji sa ekstraktom kore nara odgovara redukciji koja je dobijena sa hipohloritom koncentracije 250 ppm. Redukcija humanih norovirusa na površinama > 3 log₁₀ GE/μL je u skladu sa zahtevima koje je propisao Codex Alimentarius za virusna dezinfekciona sredstva.
12. Transmisiona elektronska mikroskopija je potvrdila antivirusni potencijal ekstrakta kore nara. U tretiranim uzorcima virusne čestice su bile potpuno dezintegrisane, u poređenju sa netretiranom kontrolom.
13. Dezinfekciona sredstva na bazi hipohlorita pokazala su se efikasna za redukciju humanih norovirusa. Koncentrovano sredstvo redukovalo je > 3 log₁₀ GE/μL HuNoV, što je u skladu sa zahtevima Codex Alimentarius. Međutim, uočeno je da prilikom primene dolazi do oštećenja površina od nerđajućeg čelika. Primenom nižih koncentracija postignuta je znatno manja redukcija. Koncentracija od 25 ppm redukovala je HuNoV na približno istom nivou kao neki od testiranih ekstrakata medicinskih biljaka.
14. Komercijalno koncentrovano biocidno sredstvo na bazi dibenzil amonijuma hlorida, deklarirano da redukuje 99,99% mikroorganizama, nije ispoljilo redukcionu potencijal na humane noroviruse.
15. Dodatna mera koja se koristi u sanitaciji površina je ispiranje vodom. Simulacija ispiranja površina vodom nakon tretmana sa dezinfekcionim sredstvima smanjila je broj čestica virusa sa obeleženih i testiranih površina. Dezinfekciono sredstvo na bazi hipohlorita, nakon ispiranja sa vodom redukovalo je viruse za 3,76 log₁₀ GE/μL (nerđajući čelik) i 3,1 log₁₀ GE/μL (plastika). Nakon tretmana sa dezinfekcionim sredstvom na bazi dibenzil amonijum hlorida i ispiranja sa vodom humani norovirusi redukovani su za 3,12 log₁₀ GE/μL (nerđajući čelik) i 2,45 log₁₀ GE/μL (plastika). Dobijena redukcija virusa sa dezinfekcionim

sredstvom na bazi dibenzil amonijum hlorida se može prepisati fizičkim uklanjanjem vodom prilikom ispiranja.

16. Dezinfekcijom površina od nerđajućeg čelika i plastike vlažnim antibakterijskim maramicama sa aktivnom komponentom hlorheksidin (4%) postignut je smanjen broj humanih norovirusa. Ostaje otvoreno pitanje da li redukcija humanih norovirusa sa vlažnim maramicama na površinama potiče od aktivne komponente hlorheksidin (4%) ili je rezultat mehaničkog uklanjanja.
17. Provera sanitacije dezinfekcionim sredstvima veštački kontaminiranih površina mešavinom suspenzija koliformne bakterije *Eserichia coli* (10^7 CFU/mL) i humanih norovirusa (10^6 GE/ μ L) vršena je primenom brzog ATP bioluminiscentnog testa i RT-qPCR metodom. Nakon dezinfekcije površina od plastike i nerđajućeg čelika sredstvom na bazi hipohlorita (250 ppm i 4,5g/100g), rezultati dobijeni primenom ATP bioluminiscentnog testa su očitani na granici zone upozorenja. Biocidnim dezinfekcionim sredstvom na bazi dibenzil amonijuma hlorida (0,75/100g) brzim ATP testom površine su detektovane u zoni koja zahteva ponovnu sanitaciju. Prisustvo humanih norovirusa na površinama potvrđeno je RT-qPCR metodom nakon dezinfekcije sa natrijum hipohloritom $2,2 \log_{10}$ GE/ μ L (nerđajući čelik) i $2,38 \log_{10}$ GE/ μ L (plastika), dok je nakon dezinfekcije sa dibenzil amonijum hloridom detektovana visoka koncentracija humanih norovirusa $3,9 \log_{10}$ GE/ μ L (nerđajući čelik) i $3,75 \log_{10}$ GE/ μ L (plastika).
18. Na sterilne površine nerđajućeg čelika aplikovane su različite koncentracije humanih norovirusa (10^6 , 10^5 , 10^4 i 10^3 GE/ μ L) i izvršeno je uzorkovanje površina brisevima u okviru primene FLASH® alergen indikator protein testa. Test se zasniva na vizuelnoj detekciji koja se manifestuje promenom boje tečnosti u kojoj se inkubira bris (od zelene - nije detektovano prisustvo proteina do različitih nijansi ljubičaste - detektovano prisustvo proteina). Senzitivnost reakcije se povećana kada su brisevi inkubirani na $70^\circ\text{C}/10$ min. Nakon inkubacije briseva uzetih sa površina na kojima su aplikovane različite koncentracije humanih norovirusa došlo je do promene boje u zavisnosti od koncentracije. Uzorak sa najvećom koncentracijom virusa uzrokovao je promenu boje u tamno ljubičastu.
19. Može se zaključiti da je u doktorskoj disertaciji izvršena hemijska karakterizacija ekstrakta kore ploda nara i matičnog soka od ploda nara (sadržaj ukupnih fenola i tanina, sadržaj punikalagina, punikalina, galne i elagne kiseline). Pokazano je da ekstrakt kore nara ima veći sadržaj određivanih fenolnih komponenti i veći antivirusni potencijal na norovirus i to ukazuje na moguću pozitivnu korelaciju između sadržaja fenolnih komponenti u ekstraktu/soku i njegove antivirusne aktivnosti. Hemijski profil i ispoljene aktivnosti ekstrakata potvrđuju primenu ekstrakata kore nara (*Punica granatum L.*) u ishrani i tradicionalnoj medicini. Takođe, ova istraživanja otvaraju vrata novim područjima primene ekstrakta kore nara u sanitaciji namirnica u cilju smanjenju biohazarda i predstavljaju dobru osnovu za naredna istraživanja.

7. LITERATURA

Abid, M., Yaich, H., Cheikhrouhou, S., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H., Ayadi, M. A. (2017). Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC–MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2890–2901.

Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C. G., Reed, J. D., Mukhtar, H. (2004). Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*, 113(3), 423–433.

Ahmad, R., Borowiec, P., Falck-Ytter, A. B., Strætkvern, K. O. (2017). Extraction, Solubility and Antimicrobial Activity of (-) Usnic Acid in Ethanol, a Pharmaceutically Relevant Solvent. *Natural Product Communications*, 12(7), 1934578X1701200.

Ahmad, S. R., Gokulakrishnan, P., Giriprasad, R., Yattoo, M. A. (2013). Fruit-based Natural Antioxidants in Meat and Meat Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1503–1513.

Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Koopmans, M., Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 725–730.

Akasaka, T., Shimizu-Onda, Y., Hayakawa, S., Ushijima, H. (2016). The virucidal effects against murine norovirus and feline calicivirus F4 as surrogates for human norovirus by the different additive concentrations of ethanol-based sanitizers. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(3), 191–193.

Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417–425.

Alexandre, E. M., Silva, S., Santos, S. A., Silvestre, A. J., Duarte, M. F., Saraiva, J. A., Pintado, M. (2019). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. *Food Research International*, 115, 167–176.

Allen, D. J., Trainor, E., Callaghan, A., O'Brien, S. J., Cunliffe, N. A., Iturriza-Gómara, M. (2016). Early Detection of Epidemic GII-4 Norovirus Strains in UK and Malawi: Role of Surveillance of Sporadic Acute Gastroenteritis in Anticipating Global Epidemics. *PLOS ONE*, 11(4), e0146972.

Al-Said, F., Opara, L., Al-Yahyai, R. (2009). Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 129–134.

Alvarado, G., Ettayebi, K., Atmar, R. L., Bombardi, R. G., Kose, N., Estes, M. K., Crowe Jr, J. E. (2018). Human monoclonal antibodies that neutralize pandemic GII. 4 noroviruses. *Gastroenterology*, 155(6), 1898-1907.

Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters. (2019). *EFSA Journal*, 17(7).

Anderson, T. F., Stanley, W. (1941). A study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum. *Journal of Biological Chemistry*, 139(1), 339–344.

- Annous, B. A., Buckley, D. A., Kingsley, D. H. (2021). Efficacy of Chlorine Dioxide Gas Against Hepatitis A Virus on Blueberries, Blackberries, Raspberries, and Strawberries. *Food and Environmental Virology*, 13(2), 241–247
- Appleton, H., and Pereira, M. (1977). A possible virus aetiology in outbreaks of food-poisoning from cockles. *The Lancet*, 309(8015), 780–781.
- Arun, K. B., Jayamurthy, P., Anusha, C. V., Mahesh, S. K., and Nisha, P. (2016). Studies on Activity Guided Fractionation of Pomegranate Peel Extracts and Its Effect on Antidiabetic and Cardiovascular Protection Properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e13108.
- Asgary, S., Javanmard, S., and Zarfeshany, A. (2014). Potent health effects of pomegranate. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 100.
- Assab, R., Temime, L. (2016). The role of hand hygiene in controlling norovirus spread in nursing homes. *BMC Infectious Diseases*, 16(1).
- Atmar, R. L. (2010). Noroviruses: State of the Art. *Food and Environmental Virology*, 2(3), 117–126.
- Atmar, R. L., and Estes, M. K. (2006). The Epidemiologic and Clinical Importance of Norovirus Infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35(2), 275–290.
- Atmar, R. L., Neill, F. H., le Guyader, F. S. (2010). Detection of Human Caliciviruses in Fecal Samples by RT-PCR. *Diagnostic Virology Protocols*, 39–50.
- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H., & Graham, D. Y. (2008). Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1553–1557.
- Authority, European Food Safety, EFSA (2021). The European Union one health 2019 zoonoses report. *EFSA Journal*, 19(2).
- Ayukekbong, J. A., Mesumbe, H. N., Oyero, O. G., Lindh, M., Bergström, T. (2015). Role of noroviruses as aetiological agents of diarrhoea in developing countries. *Journal of General Virology*, 96(8), 1983–1999.
- Baehner, F., Bogaerts, H., Goodwin, R. (2016). Vaccines against norovirus: state of the art trials in children and adults. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, S136–S139.
- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., van Coillie, E., Herman, L., Uyttendaele, M. (2011). Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 261–269.
- Bajrai, L. H., El-Kafrawy, S. A., Alnahas, R. S., Azhar, E. I. (2021). In vitro screening of anti-viral and virucidal effects against SARS-CoV-2 by *Hypericum perforatum* and *Echinacea*. *In Vitro Screening of Anti-Viral and Virucidal Effects against SARS-CoV-2 by Hypericum Perforatum and Echinacea*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.11.426295>
- Balasubramani, S. P., Varghese, R. K., Vishnuprasad, C. N., Venkatasubramanian, P. (2020). Pomegranate Juice Enhances Iron Dialysability and Assimilation in In-Vitro Cell Free and Cell-Based Models. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2), 272–278.

- Banjari, I., Misir, A., Šavikin, K., Jokić, S., Molnar, M., de Zoysa, H. K. S., Waisundara, V. Y. (2017). Antidiabetic Effects of *Aronia melanocarpa* and Its Other Therapeutic Properties. *Frontiers in Nutrition*, 4.
- Bartsch, S. M., O'Shea, K. J., Lee, B. Y. (2020). The Clinical and Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(11), 1910–1919.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D., Vuotto, M. L. (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(2), 240–248.
- Bassiri Jahromi, S., Pourshafie, M. R., Mirabzadeh, E., Tavasoli, A., Katirae, F., Mostafavi, E., Abbasian, S. (2015). *Punica granatum* Peel Extract Toxicity in Mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10(4).
- Batt, P. (2019). Comprehending and capitalising on market trends for fresh fruit and vegetables. *Acta Horticulturae*, 1258, 1–10.
- Becker, B., Henningsen, L., Paulmann, D., Bischoff, B., Todt, D., Steinmann, E., Steinmann, J., Brill, F. H. H., Steinmann, J. (2019). Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1).
- Berendt, A. E., Turnbull, L., Spady, D., Rennie, R., Forgie, S. E. (2011). Three swipes and you're out: How many swipes are needed to decontaminate plastic with disposable wipes? *American Journal of Infection Control*, 39(5), 442–443.
- BioControl Systems, 2017 <https://www.amsl.com.au/flash-rapid-protein-detection-test/>
- Birt, D. F., Widrlechner, M. P., Hammer, K. D., Hillwig, M. L., Wei, J., Kraus, G. A., ...Price, J. P. (2009). Hypericum in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. *Pharmaceutical biology*, 47(8), 774–782.
- Bogićević, D., Radin, D., Velebit, B., Radin, S., Leković, Z., Lekić, N., Lekić, D., Radulović, N., (2014): Kliničke karakteristike akutnog dijarejalnog poremećaja izazvanog norovirusom – prva iskustva u Srbiji (FAR30).
- Bölgen, N., Demir, D., Yalçın, M. S., Özdemir, S. (2020). Development of Hypericum perforatum oil incorporated antimicrobial and antioxidant chitosan cryogel as a wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1581–1590.
- Boon, D., Mahar, J. E., Abente, E. J., Kirkwood, C. D., Purcell, R. H., Kapikian, A. Z., Green, K. Y., Bok, K. (2011). Comparative Evolution of GII.3 and GII.4 Norovirus over a 31-Year Period. *Journal of Virology*, 85(17), 8656–8666.
- Borowska, S., and Brzóska, M. M. (2016). Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and their products as a possible means for the prevention and treatment of noncommunicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and food safety*, 15(6), 982-1017.
- Bosch, A., Gkogka, E., le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., van Lieshout, L., Marthi, B., Myrmel, M., Sansom, A., Schultz, A. C., Winkler, A., Zuber, S., Phister, T. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 110–128.

- Boxman, I. L. A., Verhoef, L., Dijkman, R., Hägele, G., te Loeke, N. A. J. M., Koopmans, M. (2011). Year-Round Prevalence of Norovirus in the Environment of Catering Companies without a Recently Reported Outbreak of Gastroenteritis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2968–2974.
- Bozkurt, H., Phan-Thien, K. Y., van Ogtrop, F., Bell, T., McConchie, R. (2020). Outbreaks, occurrence, and control of norovirus and hepatitis a virus contamination in berries: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(1), 116–138.
- Bridi, H., de Carvalho Meirelles, G., Lino Von Poser, G. (2021). Subtribe Hyptidinae (Lamiaceae): A promising source of bioactive metabolites. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113225.
- Brondz, I., and Brondz, A. (2012). Recent enhancement of the immunity in AIDS and other immunocompromised patients by hyperforin an antibiotic from *Hypericum perforatum* L. (in vitro model) part I. *Journal of Biophysical Chemistry*, 03(04), 304–310.
- Brown, E., Eder, A., Thompson, K. (2010). Do surface and cleaning chemistries interfere with ATP measurement systems for monitoring patient room hygiene? *Journal of Hospital Infection*, 74(2), 193–195.
- Bu, W., Mamedova, A., Tan, M., Xia, M., Jiang, X., Hegde, R. S. (2008). Structural Basis for the Receptor Binding Specificity of Norwalk Virus. *Journal of Virology*, 82(11), 5340–5347.
- Bu, W., Mamedova, A., Tan, M., Xia, M., Jiang, X., Hegde, R. S. (2008b). Structural Basis for the Receptor Binding Specificity of Norwalk Virus. *Journal of Virology*, 82(11), 5340–5347.
- Buchen-Osmond, C. (2003). The universal virus database ICTVdB. *Computing in Science & Engineering*, 5(3), 16–25.
- Bull, R. A., White, P. A. (2011). Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends in Microbiology*, 19(5), 233–240.
- Burke, R. M., Shah, M. P., Wikswa, M. E., Barclay, L., Kambhampati, A., Marsh, Z., Cannon, J. L., Parashar, U. D., Vinjé, J., Hall, A. J. (2018). The Norovirus Epidemiologic Triad: Predictors of Severe Outcomes in US Norovirus Outbreaks, 2009–2016. *The Journal of Infectious Diseases*, 219(9), 1364–1372.
- Callejón, R. M., Rodríguez-Naranjo, M. I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M. (2015). Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(1), 32–38.
- Çam, M., Erdoğan, F., Aslan, D., Dinç, M. (2013). Enrichment of Functional Properties of Ice Cream with Pomegranate By-products. *Journal of Food Science*, 78(10), C1543–C1550.
- Cannon, J. L., Barclay, L., Collins, N. R., Wikswa, M. E., Castro, C. J., Magaña, L. C., Gregoricus, N., Marine, R. L., Chhabra, P., Vinjé, J. (2019). Correction for Cannon et al., “Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses.” *Journal of Clinical Microbiology*, 57(7).
- Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osborne, J., Jaykus, L. A. Vinjé, J. (2006). Surrogates for the Study of Norovirus Stability and Inactivation in the Environment: A Comparison of Murine Norovirus and Feline Calicivirus. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2761–2765.

Cao, S., Lou, Z., Tan, M., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Zhang, X. C., Jiang, X., Li, X., Rao, Z. (2007). Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus. *Journal of Virology*, 81(11), 5949–5957.

Cates, J. E., Vinjé, J., Parashar, U., Hall, A. J. (2020). Recent advances in human norovirus research and implications for candidate vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 19(6), 539–548.

Cava, R., Nowak, E., Taboada, A., Marin-Iniesta, F. (2007). Antimicrobial Activity of Clove and Cinnamon Essential Oils against *Listeria monocytogenes* in Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection*, 70(12), 2757–2763.

CDC, National Outbreak Reporting System (NORS), CDC, Atlanta, GA, USA, 2018, <https://www.cdc.gov/norsdashboard>.

CEN-Comité Européen de Normalisation (2015) EN 14476:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements.

Center for Disease Control and Prevention. World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en>

Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2021). The Current Food Allergen Landscape. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/food/conversations-experts-food-topics/current-food-allergen-landscape>

Chan, M. C., Lee, N., Hung, T. N., Kwok, K., Cheung, K., Tin, E. K., Lai, R. W., Nelson, E. A., Leung, T. F., Chan, P. K. (2015). Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nature communications*, 6, 10061.

Chang, C. H., Sakaguchi, M., Weil, J., Verstraeten, T. (2018). The incidence of medically-attended norovirus gastro-enteritis in Japan: Modelling using a medical care insurance claims database. *PLOS ONE*, 13(3), e0195164.

Chassaing, M., Robin, M., Loutreul, J., Majou, D., Belliot, G., de Rougemont, A., Boudaud, N., Gantzer, C. (2020). The effect of proteolytic enzymes and pH on GII.4 norovirus, during both interactions and non-interaction with Histo-Blood Group Antigens. *Scientific Reports*, 10(1).

Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area. Test method and requirements (Phase 2/Step 1). EN14476:2013/FprA1:2015. (2015). <https://standard.itih.ai/catalog/standards/cen/b964b980-41d9-4730-aa30-6874fd83bade/en-14476-2013-fpra1>

Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. EN 14476:2013/A1:2015. Test method and requirements (Phase 2, Step 1). (2015). <https://standards.itih.ai/catalog/standards/cen/5e78911a-aedf-4456-90b7-39e1649f8acf/en-14476-2013a1-2015>

Chen, F. C., Godwin, S. L. (2006). Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators. *Journal of food protection*, 69(10), 2534-2538.

- Chen, H., Muhammad, I., Zhang, Y., Ren, Y., Zhang, R., Huang, X., Diao, L., Liu, H., Li, X., Sun, X., Abbas, G., & Li, G. (2019). Antiviral Activity Against Infectious Bronchitis Virus and Bioactive Components of *Hypericum perforatum* L. *Frontiers in Pharmacology*, *10*.
- Chen, J., Liao, C., Ouyang, X., Kahramanoğlu, I., Gan, Y., Li, M. (2020). Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel and Its Applications on Food Preservation. *Journal of Food Quality*, *2020*, 1–8.
- Cheng, P. W., Ho, W. Y., Su, Y. T., Lu, P. J., Chen, B. Z., Cheng, W. H., Lu, W. H., Sun, G. C., Yeh, T. C., Hsiao, M., Tseng, C. J. (2014). Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *British Journal of Pharmacology*, *171*(11), 2739–2750.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C. W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*, *100*(10), 1393–1406.
- Chitnis, V., Chitnis, S., Patil, S., and Chitnis, D. (2004). Practical limitations of disinfection of body fluid spills with 10,000 ppm sodium hypochlorite (NaOCl). *American Journal of Infection Control*, *32*(5), 306–308.
- Choi, C., and Kingsley, D. H. (2016). Temperature-Dependent Persistence of Human Norovirus Within Oysters (*Crassostrea virginica*). *Food and Environmental Virology*, *8*(2), 141–147.
- Cirak, C., Radusiene, J., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Seyis, F., Yayla, F. (2016). Secondary metabolites of seven *Hypericum* species growing in Turkey. *Pharmaceutical biology*, *54*(10), 2244–2253.
- Colas De La Noue, A., Estienney, M., Aho, S., Perrier-Cornet, J. M., de Rougemont, A., Pothier, P., Gervais, P., Belliot, G. (2014). Absolute Humidity Influences the Seasonal Persistence and Infectivity of Human Norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(23), 7196–7205.
- Cromeans, T., Park, G. W., Costantini, V., Lee, D., Wang, Q., Farkas, T., Lee, A., Vinjé, J. (2014). Comprehensive Comparison of Cultivable Norovirus Surrogates in Response to Different Inactivation and Disinfection Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(18), 5743–5751.
- Cui, Q., Du, R., Anantpadma, M., Schafer, A., Hou, L., Tian, J., Davey, R., Cheng, H., Rong, L. (2018). Identification of Ellagic Acid from Plant *Rhodiola rosea* L. as an Anti-Ebola Virus Entry Inhibitor. *Viruses*, *10*(4), 152.
- Cunningham, A. E., Rajagopal, R., Lauer, J., Allwood, P. (2011). Assessment of hygienic quality of surfaces in retail food service establishments based on microbial counts and real-time detection of ATP. *Journal of Food Protection*, *74*(4), 686–690.
- D'Souza, D. H. (2014). Phytochemicals for the control of human enteric viruses. *Current Opinion in Virology*, *4*, 44–49.
- D'Souza, D. H., and Su, X. (2010). Efficacy of Chemical Treatments Against Murine Norovirus, Feline Calicivirus, and MS2 Bacteriophage. *Foodborne Pathogens and Disease*, *7*(3), 319–326.
- D'Souza, D. H., Sair, A., Williams, K., Papafragkou, E., Jean, J., Moore, C., and Jaykus, L. (2006). Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International Journal of Food Microbiology*, *108*(1), 84–91.

- Danesi, F., and Ferguson, L. R. (2017). Could Pomegranate Juice Help in the Control of Inflammatory Diseases? *Nutrients*, 9(9), 958.
- De Carvalho Meirelles, Bridi, H., Rates, S. M. K., von Poser, G. L. (2018). Southern Brazilian Hypericum Species, Promising Sources of Bioactive Metabolites. *Studies in Natural Products Chemistry*, 491–507.
- De Graaf, M., van Beek, J., Koopmans, M. P. G. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7), 421–433.
- Debbink, K., Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Baric, R. S. (2011). Genetic Mapping of a Highly Variable Norovirus GII.4 Blockade Epitope: Potential Role in Escape from Human Herd Immunity. *Journal of Virology*, 86(2), 1214–1226.
- Degiuseppe, J. I., Gomes, K. A., Hadad, M. F., Parra, G. I., Stupka, J. A. (2017). Detection of novel GII.17 norovirus in Argentina, 2015. *Infection, Genetics and Evolution*, 47, 121–124.
- Denev, P., Číž, M., Kratchanova, M., Blazheva, D. (2019). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food chemistry*, 284, 108-117.
- Deng, W., and Gibson, K. E. (2017). Interaction of microorganisms within leafy green phyllospheres: Where do human noroviruses fit in? *International Journal of Food Microbiology*, 258, 28–37.
- Desselberger, U. (2019). Caliciviridae Other Than Noroviruses. *Viruses*, 11(3), 286.
- DiCaprio, E., Culbertson, D., Li, J. (2015). Evidence of the Internalization of Animal Caliciviruses via the Roots of Growing Strawberry Plants and Dissemination to the Fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), 2727–2734.
- Disinfectants activity testing. EN 14476:2013/A1:2015 <https://www.hygcen.de/en/services/en-14885-disinfectants.html>
- Djebbi-Simmons, D., Alhejaili, M., Janes, M., King, J., Xu, W. (2020). Survival and inactivation of human norovirus GII.4 Sydney on commonly touched airplane cabin surfaces. *AIMS Public Health*, 7(3), 574–586.
- Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., Czyżowska, A., Kucharska, A. Z., Fecka, I. (2020). Composition and antibacterial activity of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, *Cornus mas* L. and *Chaenomeles superba* Lindl. leaf extracts. *Molecules*, 25(9), 2011.
- EFSA, ECDC (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 4634
- Eggers, M., Eickmann, M., Zorn, J. (2015). Rapid and Effective Virucidal Activity of Povidone-Iodine Products Against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA). *Infectious Diseases and Therapy*, 4(4), 491–501.
- Eggers, M., Eickmann, M., Kowalski, K., Zorn, J., Reimer, K. (2015). Povidone-iodine hand wash and hand rub products demonstrated excellent *in vitro* virucidal efficacy against Ebola virus and modified vaccinia virus Ankara, the new European test virus for enveloped viruses. *BMC Infectious Diseases*, 15(1).

Eggers, M., Koburger-Janssen, T., Ward, L. S., Newby, C., Müller, S. (2018). Bactericidal and Virucidal Activity of Povidone-Iodine and Chlorhexidine Gluconate Cleansers in an In Vivo Hand Hygiene Clinical Simulation Study. *Infectious Diseases and Therapy*, 7(2), 235–247.

Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M., Ferchichi, A. (2011). Antioxidant Capacities of Phenolic Compounds and Tocopherols from Tunisian Pomegranate (*Punica granatum*) Fruits. *Journal of Food Science*, 76(5), C707–C713.

El-Senousy, W. M., El-Gamal, M. S., Mousa, A. A. E.-B., ElHawary, S. E.-S., Kamel, M. M., Fathi, M. N. and El-Mahdy, E.-M. M. (2014). Effect of Chlorine on Noroviruses, Rotaviruses and Hepatitis E Virus in Drinking Water, *World Applied Sciences Journal* 32(11): 2206–2212.

Elsherbiny, E. A., Amin, B. H., Baka, Z. A. (2016). Efficiency of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels extract as a high potential natural tool towards Fusarium dry rot on potato tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 256–263.

EN14476:2013/FprA1:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area. Test method and requirements (Phase 2/Step 1). 2015.

Environmental Protection Agency. (2019). Final Rule Clarifying Toxicology Data Requirements for Antimicrobial Pesticides Used on Food Contact Surfaces. <https://www.epa.gov/pesticides/final-rule-clarifying-toxicology-data-requirements-antimicrobial-pesticides-used-food>

Escudero, B. I., Rawsthorne, H., Gensel, C., Jaykus, L. A. (2012). Persistence and Transferability of Noroviruses on and between Common Surfaces and Foods. *Journal of Food Protection*, 75(5), 927–935.

Esposito, S., and Principi, N. (2020). Norovirus Vaccine: Priorities for Future Research and Development. *Frontiers in Immunology*, 11.

Esseili, M. A., Wang, Q., Saif, L. J. (2011). Binding of Human GII.4 Norovirus Virus-Like Particles to Carbohydrates of Romaine Lettuce Leaf Cell Wall Materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 786–794.

Estes, M. K., Prasad, B. V., Atmar, R. L. (2006). Noroviruses everywhere: has something changed? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 467–474.

European Commission Directorate-General For Health And Food Safety. DG(Sante) 2019-6698. (2019). Evaluate the systems in place to control microbiological contamination in food of non-animal origin intended for export to the European Union.

European Commission Health and Consumers Directorate-General. In order to Assess the Control Systems in Place to Control Microbiological Contamination in Raspberries Intended for Export to The European Union. DG(SANCO) 2013-6660 - Mr Final (2013).

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *Efsa Journal*, 13(12), 4329.

European Pharmacopoeia (2011). 7th ed. Strasbourg: Council of Europe

European Statistics Handbook - Fruit Logistica 2020. Published by Fruit Logistica
<https://www.fruitlogistica.com/en/about/european-statistics-handbook/>

Falcó, I., Randazzo, W., Gómez-Mascaraque, L. G., Aznar, R., López-Rubio, A., Sánchez, G. (2018). Fostering the antiviral activity of green tea extract for sanitizing purposes through controlled storage conditions. *Food Control*, 84, 485–492.

Fallahi, S., Mattison, K. (2011). Evaluation of Murine Norovirus Persistence in Environments Relevant to Food Production and Processing. *Journal of Food Protection*, 74(11), 1847–1851.

Fanson, B. G., Osmack, P., di Bisceglie, A. M. (2000). A comparison between the phenol–chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *Journal of Virological Methods*, 89(1–2), 23–27.

Fanson, B. G., Osmack, P., di Bisceglie, A. M. (2000). A comparison between the phenol–chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *Journal of Virological Methods*, 89(1–2), 23–27.

Fauquet, C., and Fargette, D. (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*, 2(1).

Fawole, O. A., and Opara, U. L. (2013). Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. ‘Bhagwa’). *South African Journal of Botany*, 85, 23–31.

Fischer, U. A., Carle, R., Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chemistry*, 127(2), 807–821.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). *Microbiological Hazards in Fresh Fruits and Vegetables*; FAO/WHO: Geneva, Switzerland, 2008.

Food and Drug Administration, FDA issues final rule on safety and effectiveness of antibacterial soaps. (2016). *Focus on Surfactants*, 2016(10), 4.

Ford-Siltz, L., Mullis, L., Sanad, Y., Tohma, K., Lepore, C., Azevedo, M., Parra, G. (2019). Genomics Analyses of GIV and GVI Noroviruses Reveal the Distinct Clustering of Human and Animal Viruses. *Viruses*, 11(3), 204.

Frank, B., Conzelmann, C., Weil, T., Groß, R., Jungke, P., Eggers, M., Müller, J. A., Münch, J., Kessler, U. (2020). Antiviral activity of plant juices and green tea against SARS-CoV-2 and influenza virus *in vitro*. bioRxiv 2020.10.30.360545.

Friedman, M. (2014). Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to Their Flavonoid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6025–6042.

Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E. (2006). Antimicrobial Wine Formulations Active Against the Foodborne Pathogens *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Science*, 71(7), M245–M251.

Frost and Sullivan (2013). Natural shelf-life extension food additives set to overtake synthetic antioxidants. North - American shelf life extension food additives market. 18-01-2013. <http://en.prnasia.com/story/73614-0.shtml>.

Gao, X., Esseili, M. A., Lu, Z., Saif, L. J., Wang, Q. (2016). Recognition of Histo-Blood Group Antigen-Like Carbohydrates in Lettuce by Human GII.4 Norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(10), 2966–2974.

Gibson, K. E., and Schwab, K. J. (2011). Thermal Inactivation of Human Norovirus Surrogates. *Food and Environmental Virology*, 3(2), 74–77.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581–4589.

Giménez-Bastida, J. A., Ávila-Gálvez, M. Á., Espín, J. C., González-Sarriás, A. (2021). Evidence for health properties of pomegranate juices and extracts beyond nutrition: A critical systematic review of human studies. *Trends in Food Science and Technology*, 114, 410-423.

Glass, R. I., Parashar, U. D., Estes, M. K. (2009). Norovirus Gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 361(18), 1776–1785.

Global pomegranate sales market report 2020. (2020). <https://www.360marketupdates.com/global-pomegranate-sales-market-16678837>

Goda, H., Nakayama-Imahiji, H., Yamaoka, H., Tada, A., Nagao, T., Fujisawa, T., Koyama, A. H., Kuwahara, T. (2022). Inactivation of human norovirus by chlorous acid water, a novel chlorine-based disinfectant. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 28(1), 67–72.

Goor A, Liberman. (1956). The pomegranate. In: Atsmon J (Ed) State of Israel, Ministry of Agriculture, Agriculture Publication Section, Tel Aviv, 5-57.

Govea-Salas, M., Rivas-Estilla, A. M., Rodríguez-Herrera, R., Lozano-Sepúlveda, S. A., Aguilar-Gonzalez, C. N., Zugasti-Cruz, A., Salas-Villalobos, T. B., Morlett-Chávez, J. A. (2015). Gallic acid decreases hepatitis C virus expression through its antioxidant capacity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(2), 619–624.

Graham, S. A., Hall, J., Sytsma, K., Shi, S. (2005). Phylogenetic Analysis of the Lythraceae Based on Four Gene Regions and Morphology. *International Journal of Plant Sciences*, 166(6), 995–1017.

Greaves, J., Stone, D., Wu, Z., Bibby, K. (2020). Persistence of emerging viral fecal indicators in large-scale freshwater mesocosms. *Water Research X*, 9, 100067.

Green KY. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA et al., eds. *Fields virology*, 6th ed. Philadelphia: Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins; 2013, 582–608.

- Greening, G. E., and Cannon, J. L. (2016). Human and Animal Viruses in Food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). *Viruses in Foods*, 5–57.
- Greening, G. E., Cannon, J. L. (2016). Human and Animal Viruses in Food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). *Viruses in Foods*, 5–57.
- Gutiérrez-del-Río, I., Fernández, J., Lombó, F. (2018). Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: Terpenoids, polyphenols and thiols. *International journal of antimicrobial agents*, 52(3), 309-315.
- Haidari, M., Ali, M., Casscells III, S. W., Madjid, M. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, 16(12), 1127-1136.
- Hall, A. J. (2012). Noroviruses: The Perfect Human Pathogens? *Journal of Infectious Diseases*, 205(11), 1622–1624.
- Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastañaduy, P. A., Vinjé, J., Parashar, U. D. (2013). Norovirus Disease in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1198–1205.
- Hall, A. J., Wikswo, M. E., Pringle, K., Gould, L. H., Parashar, U. D., Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, CDC (2014). Vital signs: foodborne norovirus outbreaks - United States, 2009-2012. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 63(22), 491–495.
- Hall, A., Vinjé, J., Lopman, B., Park, G., Yen, C., Gregoricus, N., Parashar, U. (2011). Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*, 60(3), 1-15.
- Hall, A.J., Vinjé, J., Lopman, B.A., Parashar, U.D., Park, G.W., Yen, C., Gregoricus, N.A., & Parashar U., (2011). Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (2011). Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 60 (RR-3), 1–18.
- Hardstaff, J. L., Clough, H. E., Lutje, V., McIntyre, K. M., Harris, J. P., Garner, P., O'Brien, S. J. (2018). Foodborne and Food-Handler Norovirus Outbreaks: A Systematic Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(10), 589–597.
- Hardy, M. E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 1–8.
- Hasnaoui, N., Wathelet, B., Jiménez-Araujo, A. (2014). Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chemistry*, 160, 196–203.
- Hassan, E., Baldrige, M. T. (2019). Norovirus encounters in the gut: multifaceted interactions and disease outcomes. *Mucosal Immunology*, 12(6), 1259–1267.
- Hayrapetyan, H., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*, 23(1), 66–72.

- Heber, D., Seeram, N. P., Wyatt, H., Henning, S. M., Zhang, Y., Ogden, L. G., ... Hill, J. O. (2007). Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(24), 10050-10054.
- Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Fraisse, A., Perelle, S. (2017). Comparison of three extraction methods to detect noroviruses in dairy products. *Food Microbiology*, 61, 113–119.
- Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Fraisse, A., Perelle, S. (2017). Comparison of three extraction methods to detect noroviruses in dairy products. *Food Microbiology*, 61, 113–119.
- Herman, K. M., Hall, A. J., Gould, L. H. (2015). Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. *Epidemiology and Infection*, 143(14), 3011–3021.
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., Davidson, P. M., Stewart, C. N. (2014). Antimicrobial Activity of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extracts against Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations. *Journal of Food Protection*, 77(2), 262–268.
- Hirneisen, K. A., Kniel, K. E. (2013). Comparing Human Norovirus Surrogates: Murine Norovirus and Tulane Virus. *Journal of Food Protection*, 76(1), 139–143.
- Hjertqvist, M., Johansson, A., Svensson, N., Abom, P. E., Magnusson, C., Olsson, M., Hedlund, K. O., Andersson, Y. (2006). Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June-August 2006. *Weekly Releases (1997–2007)*, 11(36).
- Hoelzer, K., Fanaselle, W., Pouillot, R., Van Doren, J. M., & Dennis, S. (2013). Virus Inactivation on Hard Surfaces or in Suspension by Chemical Disinfectants: Systematic Review and Meta-Analysis of Norovirus Surrogates. *Journal of Food Protection*, 76(6), 1006–1016.
- Horm, K. M., Harte, F. M., D'souza, D. H. (2012). Human Norovirus Surrogate Reduction in Milk and Juice Blends by High Pressure Homogenization. *Journal of Food Protection*, 75(11), 1984–1990.
- Huhti, L., Szakal, E. D., Puustinen, L., Salminen, M., Huhtala, H., Valve, O., Blazevic, V., Vesikari, T. (2011). Norovirus GII-4 Causes a More Severe Gastroenteritis Than Other Noroviruses in Young Children. *Journal of Infectious Diseases*, 203(10), 1442–1444.
- Ikner, L. A., Gerba, C. P., Bright, K. R. (2012). Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. *Food and Environmental Virology*, 4(2), 41–67.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/caliciviridae/1167/genus-norovirus
- Ionidis, G., Hübscher, J., Jack, T., Becker, B., Bischoff, B., Todt, D., Hodasa, V., Brill, F. H. H., Steinmann, E., Steinmann, J. (2016). Development and virucidal activity of a novel alcohol-based hand disinfectant supplemented with urea and citric acid. *BMC Infectious Diseases*, 16(1).
- Ismail, T., Akhtar, S., Riaz, M., Ismail, A. (2014). Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(6), 661–666.
- Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 397–405.

- Ismail, T., Suleman, R., Akram, K., Hameed, A., Llah, I. U., Amir, M., Akhtar, S. (2019). Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extracts Inhibit Microbial Growth and Lipid Oxidation in Minced Shrimps Stored at 4°C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(1), 84–92.
- Ituriza-Gómara, M., Elliot, A. J., Dockery, C., Fleming, D. M., Gray, J. J. (2009). Structured surveillance of infectious intestinal disease in pre-school children in the community: 'The Nappy Study'. *Epidemiology and Infection*, 137(7), 922–931.
- Jang, M., Park, Y. I., Cha, Y. E., Park, R., Namkoong, S., Lee, J. I., Park, J. (2020). Tea Polyphenols EGCG and Theaflavin Inhibit the Activity of SARS-CoV-2 3CL-Protease In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1–7.
- Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M. K. (1993). Sequence and Genomic Organization of Norwalk Virus. *Virology*, 195(1), 51–61.
- Jimenez, L., Chiang, M. (2006). Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus: A surrogate for norovirus. *American Journal of Infection Control*, 34(5), 269–273.
- Joshi, S. S., Dice, L., D'Souza, D. H. (2015). Aqueous Extracts of Hibiscus sabdariffa Calyces Decrease Hepatitis A Virus and Human Norovirus Surrogate Titers. *Food and Environmental Virology*, 7(4), 366–373.
- Joshi, S. S., Su, X., D'Souza, D. H. (2015). Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis A virus in model food systems and under gastric conditions. *Food Microbiology*, 52, 1–10.
- Joshi, S., Howell, A. B., D'Souza, D. H. (2017). Blueberry proanthocyanidins against human norovirus surrogates in model foods and under simulated gastric conditions. *Food Microbiology*, 63, 263–267.
- Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 2988–2995.
- Kahramanoglu, İ. (2019). Trends in pomegranate sector: production, postharvest handling and marketing. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 3 (2), 239-246.
- Kamimoto, M., Nakai, Y., Tsuji, T., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2014). Antiviral Effects of Persimmon Extract on Human Norovirus and Its Surrogate, Bacteriophage MS2. *Journal of Food Science*, 79(5), M941–M946.
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Chanock, R. M. (1972). Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10(5), 1075–1081.
- Karimi, A., Moradi, M. T., Rabiei, M., Alidadi, S. (2020). In vitro anti-adenoviral activities of ethanol extract, fractions, and main phenolic compounds of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 28, 204020662091657.
- Karst, S. M. (2010). Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. *Viruses*, 2(3), 748–781.

- Karst, S., Wobus, C., Goodfellow, I., Green, K., Virgin, H. (2014). Advances in Norovirus Biology. *Cell Host Microbe*, 15(6), 668–680.
- Kauppinen, A., and Miettinen, I. (2017). Persistence of Norovirus GII Genome in Drinking Water and Wastewater at Different Temperatures. *Pathogens*, 6(4), 48.
- Khadivi, A., Ayenehkar, D., Kazemi, M., Khaleghi, A. (2018). Phenotypic and pomological characterization of a pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm collection and identification of the promising selections. *Scientia Horticulturae*, 238, 234–245.
- Khalifa, I., Zhu, W., Mohammed, H. H. H., Dutta, K., Li, C. (2020). Tannins inhibit SARS-CoV-2 through binding with catalytic dyad residues of 3CL pro: An in-silico approach with 19 structural different hydrolysable tannins. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10).
- Kim, L., Liebowitz, D., Lin, K., Kasperek, K., Pasetti, M. F., Garg, S. J., Gottlieb, K., Trager, G., & Tucker, S. N. (2018). Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial. *JCI Insight*, 3(13).
- Kim, S. W., Baek, S. B., Lee, M. H., Choi, C., Ha, S. D. (2011). Ethanol inactivates feline calicivirus and murine norovirus, as human norovirus surrogates on stainless steel surfaces. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(6), 915–920.
- Kingsley, D. H., Vincent, E. M., Meade, G. K., Watson, C. L., Fan, X. (2014). Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 94–99.
- Kitajima, M., Rachmadi, A. T., Iker, B. C., Haramoto, E., Gerba, C. P. (2016). Genetically distinct genogroup IV norovirus strains identified in wastewater. *Archives of Virology*, 161(12), 3521–3525.
- Knight, A., Haines, J., Stals, A., Li, D., Uyttendaele, M., Knight, A., Jaykus, L. A. (2016). A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 40–49.
- Kocher, J., and Yuan, L. (2015). Norovirus vaccines and potential antinorovirus drugs: recent advances and future perspectives. *Future Virology*, 10(7), 899–913.
- Kojadinovic, M. I., Arsic, A. C., Debeljak-Martacic, J. D., Konic-Ristic, A. I., Kardum, N. D., Popovic, T. B., & Glibetic, M. D. (2016). Consumption of pomegranate juice decreases blood lipid peroxidation and levels of arachidonic acid in women with metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1798–1804.
- Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Söderberg, K., Vasickova, P., Bouwknecht, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A. M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., von Bonsdorff, C. H., Rzeżutka, A., Petrovic, T., Maunula, L., Pavlik, I., Vantarakis, A. (2016). Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains. *Food and Environmental Virology*, 9(1), 72–78.
- Kotwal, G. J. (2018). Preventing future emerging viral infections using broad-spectrum antivirals. *Future Virology*, 13(4), 229–232.
- Kotwal, G., Cannon, J. L. (2014). Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current Opinion in Virology*, 4, 37–43.

- Kremer, D., Kosir, I. J., Koncic, M. Z., Cerenak, A., Potocnik, T., Srecec, S., Kosalec, I. (2015). Antimicrobial and antioxidant properties of *Satureja montana* L. and *S. subspicata* Vis. (Lamiaceae). *Current Drug Targets*, 16(14), 1623-1633.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology*, 158(10), 2059–2068.
- Lahou, E., Uyttendaele, M. (2014). Evaluation of Three Swabbing Devices for Detection of *Listeria monocytogenes* on Different Types of Food Contact Surfaces. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), 804–814.
- Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S. E., Jean, J. (2008). Evaluation of the Persistence of Infectious Human Noroviruses on Food Surfaces by Using Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3349–3355.
- Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S. E., Jean, J. (2009). Molecular Study of the Persistence of Infectious Human Norovirus on Food-Contact Surfaces. *Food and Environmental Virology*, 1(2), 51–56.
- Lane, K., McLandsborough, L. A., Autio, W. R., & Kinchla, A. J. (2020). Efficacy of ATP Monitoring for Measuring Organic Matter on Postharvest Food Contact Surfaces. *Journal of Food Protection*, 83(10), 1829-1837.
- Lee, J., Zoh, K., Ko, G. (2008). Inactivation and UV Disinfection of Murine Norovirus with TiO₂ under Various Environmental Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2111–2117.
- Leen, E. N., Baeza, G., Curry, S. (2012). Correction: Structure of a Murine Norovirus NS6 Protease-Product Complex Revealed by Adventitious Crystallisation. *PLoS ONE*, 7(9).
- Levin, G. M. 2006. Pomegranate, first ed. Third Millennium Publishing, Tempe.
- Li Destri Nicosia, M. G., Pangallo, S., Raphael, G., Romeo, F. V., Strano, M. C., Rapisarda, P., Droby, S., Schena, L. (2016). Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 54–61.
- Li, D., Baert, L., Uyttendaele, M. (2013). Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. *Food Microbiology*, 35(1), 1–9.
- Li, D., Baert, L., de Jonghe, M., van Coillie, E., Ryckeboer, J., Devlieghere, F., Uyttendaele, M. (2011). Inactivation of Murine Norovirus 1, Coliphage φX174, and *Bacillus fragilis* Phage B40-8 on Surfaces and Fresh-Cut Iceberg Lettuce by Hydrogen Peroxide and UV Light. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1399–1404.
- Li, D., Baert, L., Zhang, D., Xia, M., Zhong, W., van Coillie, E., Jiang, X., Uyttendaele, M. (2012). Effect of Grape Seed Extract on Human Norovirus GII.4 and Murine Norovirus 1 in Viral Suspensions, on Stainless Steel Discs, and in Lettuce Wash Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7572–7578.
- Li, D., de Keuckelaere, A., Uyttendaele, M. (2015). Fate of Foodborne Viruses in the “Farm to Fork” Chain of Fresh Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 755–770.

- Li, J., He, X., Li, M., Zhao, W., Liu, L., Kong, X. (2015). Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. *Food Chemistry*, 176, 7–11.
- Li, X., Chen, H., Kingsley, D. H. (2013). The influence of temperature, pH, and water immersion on the high hydrostatic pressure inactivation of GI.1 and GII.4 human noroviruses. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 138–143.
- Li, Y., Yang, F., Zheng, W., Hu, M., Wang, J., Ma, S., Deng, Y., Luo, Y., Ye, T., Yin, W. (2016). *Punica granatum* (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer *in vitro*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 80, 227–235.
- Lin, L. T., Chen, T. Y., Lin, S. C., Chung, C. Y., Lin, T. C., Wang, G. H., Anderson, R., Lin, C. C., Richardson, C. D. (2013). Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiology*, 13(1), 187.
- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., LePendou, J., Baric, R. (2003b). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine*, 9(5), 548–553.
- Liu, C., Cai, D., Zhang, L., Tang, W., Yan, R., Guo, H., Chen, X. (2016). Identification of hydrolyzable tannins (punicalagin, punicalin and geraniin) as novel inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Antiviral Research*, 134, 97–107.
- Liu, G., Xiong, S., Xiang, Y. F., Guo, C. W., Ge, F., Yang, C. R., Zhang, Y. J., Wang, Y. F., Kitazato, K. (2011). Antiviral activity and possible mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus. *Archives of Virology*, 156(8), 1359–1369.
- Liu, P., Chien, Y. W., Papafragkou, E., Hsiao, H. M., Jaykus, L. A., Moe, C. (2009). Persistence of Human Noroviruses on Food Preparation Surfaces and Human Hands. *Food and Environmental Virology*, 1(3–4), 141–147.
- Lloyd, K. G., MacGregor, B. J., Teske, A. (2010). Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 143–151.
- Lloyd, K. G., MacGregor, B. J., Teske, A. (2010). Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 143–151.
- Lopez, G. U., Kitajima, M., Havas, A., Gerba, C. P., Reynolds, K. A. (2014b). Evaluation of a Disinfectant Wipe Intervention on Fomite-to-Finger Microbial Transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3113–3118.
- Lopman, B. A., Steele, D., Kirkwood, C. D., Parashar, U. D. (2016). The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLOS Medicine*, 13(4), e1001999.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., Franco, D. (2018). Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: general aspects and overall description. In *Innovative technologies for food preservation* (pp.53-107). Academic Press.

- Lowther, J., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Mäde, D., Rutjes, S., Hardouin, G., Lombard, B., In't Veld, P., Leclercq, A. (2019). Validation of EN ISO method 15216 - Part 1 – Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 288, 82–90.
- Lowther, J., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Mäde, D., Rutjes, S., Hardouin, G., Lombard, B., In't Veld, P., Leclercq, A. (2019). Validation of EN ISO method 15216 - Part 1 – Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 288, 82–90.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R. (2013). Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Food and Environmental Virology*, 5(3), 162–168.
- Mahar, J. E., Bok, K., Green, K. Y., Kirkwood, C. D. (2013). The Importance of Intergenic Recombination in Norovirus GII.3 Evolution. *Journal of Virology*, 87(7), 3687–3698.
- Mans, J., Murray, T. Y., Nadan, S., Netshikweta, R., Page, N. A., Taylor, M. B. (2015). Norovirus diversity in children with gastroenteritis in South Africa from 2009 to 2013: GII.4 variants and recombinant strains predominate. *Epidemiology and Infection*, 144(5), 907–916.
- Markham, R., Hitchborn, J., Hills, G., & Frey, S. (1964). The anatomy of the tobacco mosaic virus. *Virology*, 22(3), 342–359.
- Mars, M. (2000). Pomegranate plant material: Genetic resources and breeding, a review. *Options Mediterraneennes Serie A*, 42, 55-62.
- Mars, M. (2000). Pomegranate plant material: Genetic resources and breeding, a review. *Options Mediterraneennes Serie A*, 42, 55-62.
- Mathon, C., Chater, J. M., Green, A., Merhaut, D. J., Mauk, P. A., Preece, J. E., Larive, C. K. (2019). Quantification of punicalagins in commercial preparations and pomegranate cultivars, by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(8), 4036–4042.
- Matsushima, Y., Shimizu, T., Ishikawa, M., Komane, A., Okabe, N., Ryo, A., Kimura, H., Katayama, K., Shimizu, H. (2016). Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announcements*, 4(5).
- Mattison, K., Karthikeyan, K., Abebe, M., Malik, N., Sattar, S. A., Farber, J. M., Bidawid, S. (2007). Survival of Calicivirus in Foods and on Surfaces: Experiments with Feline Calicivirus as a Surrogate for Norovirus. *Journal of Food Protection*, 70(2), 500503.
- Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkelä, S., Söderberg, K., Summa, M., von Bonsdorff, C. H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., Niskanen, T. (2009). Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Eurosurveillance*, 14(49).
- Melhem, N. M., Abou Hassan, F. F., Ramadan, M. (2019). The Current Status of Norovirus Vaccine Development. *Norovirus*, 189–242.

- Middha, S. K., Usha, T., Pande, V. (2013). A Review on Antihyperglycemic and Antihepatoprotective Activity of Eco-Friendly *Punica granatum* Peel Waste. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–10.
- Mirdehghan, S. H., & Rahemi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111(2), 120–127.
- Moradi, M. T., Karimi, A., Shahrani, M., Hashemi, L., Ghaffari-Goosheh, M. S. (2019). Anti-Influenza Virus Activity and Phenolic Content of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract and Fractions. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 11(4), 285–291.
- Mori, K., Hayashi, Y., Akiba, T., Noguchi, Y., Yoshida, Y., Kai, A., Yamada, S., Sakai, S., Hara, M. (2007). Effects of Hand Hygiene on Feline Calicivirus Inactivation and Removal as Norovirus Surrogate Treated with Antiseptic Hand Rubbing, Wet Wipes, and Functional Water. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 81(3), 249–255.
- Motoya, T., Nagasawa, K., Matsushima, Y., Nagata, N., Ryo, A., Sekizuka, T., Yamashita, A., Kuroda, M., Morita, Y., Suzuki, Y., Sasaki, N., Katayama, K., Kimura, H. (2017). Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974–2015. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Mphahlele, R. R., Fawole, O. A., Makunga, N. P., Opara, U. L. (2016). Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1).
- Müller, L., Schultz, A. C., Fonager, J., Jensen, T., Lisby, M., Hindsdal, K., Krusell, L., Eshøj, A., Møller, L. T., Porsbo, L. J., Böttiger, B. E., Kuhn, K., Engberg, J., Ethelberg, S. (2014). Separate Norovirus Outbreaks Linked To One Source Of Imported Frozen Raspberries By Molecular Analysis, Denmark, 2010–2011. *Epidemiology And Infection*, 143(11), 2299–2307.
- Nenonen, N. P., Hannoun, C., Svensson, L., Toren, K., Andersson, L. M., Westin, J., Bergstrom, T. (2014). Norovirus GII.4 Detection in Environmental Samples from Patient Rooms during Nosocomial Outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2352–2358.
- Nordgren, J., Sharma, S., Kambhampati, A., Lopman, B., Svensson, L. (2016). Innate Resistance and Susceptibility to Norovirus Infection. *PLOS Pathogens*, 12(4), e1005385.
- Norovirus Outbreaks Reported to NoroSTAT, Figure | CDC. (2021). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/norostat/data.html>
- Norovirus Virus Classification | CDC. (2019). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/norovirus/lab/virus-classification.html>
- Oh, M., Bae, S. Y., Lee, J. H., Cho, K. J., Kim, K. H., Chung, M. S. (2012). Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) juice on foodborne viral surrogates. *Foodborne pathogens and disease*, 9(10), 915–921.
- Okada, J., Yamamizu, Y., Fukai, K. (2016). Effectiveness of hand hygiene depends on the patient's health condition and care environment. *Japan Journal of Nursing Science*, 13(4), 413–423.
- Orgil, O., Schwartz, E., Baruch, L., Matityahu, I., Mahajna, J., Amir, R. (2014). The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 571–577.

- Osimani, A., Garofalo, C., Clementi, F., Tavoletti, S., Aquilanti, L. (2014). Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. *International journal of environmental research and public health*, 11(10), 10824-10837.
- Oude Munnink, B., van der Hoek, L. (2016). Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. *Viruses*, 8(2), 42.
- Paari, A., Naidu, H. K., Kanmani, P., Satishkumar, R., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Arul, V. (2011). Evaluation of Irradiation and Heat Treatment on Antioxidant Properties of Fruit Peel Extracts and Its Potential Application During Preservation of Goat Fish *Parupenaeus indicus*. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1860–1870.
- Panousi, M. N., Williams, G. J., Girdlestone, S., Hiom, S. J., Maillard, J. Y. (2009). Evaluation of alcohol wipes used during aseptic manufacturing. *Letters in applied microbiology*, 48(5), 648–651.
- Papadopoulou, C., Soulti, K. i Roussis, I.G. (2005). Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (1), 41-46.
- Papapanagiotou, E. (2017). Foodborne Norovirus State of Affairs in the EU Rapid Alert System for Food and Feed, *Veterinary Sciences* 4(4): 61
- Pareek, S., Valero, D., Serrano, M. (2015). Postharvest biology and technology of pomegranate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2360–2379.
- Park, G. W., Sobsey, M. D. (2011). Simultaneous Comparison of Murine Norovirus, Feline Calicivirus, Coliphage MS2, and GII.4 Norovirus to Evaluate the Efficacy of Sodium Hypochlorite Against Human Norovirus on a Fecally Soiled Stainless Steel Surface. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(9), 1005–1010.
- Park, G. W., Barclay, L., Macinga, D., Charbonneau, D., Pettigrew, C. A., Vinjé, J. (2010). Comparative Efficacy of Seven Hand Sanitizers against Murine Norovirus, Feline Calicivirus, and GII.4 Norovirus. *Journal of Food Protection*, 73(12), 2232–2238.
- Park, S., Kim, J. I., Lee, I., Lee, S., Hwang, M. W., Bae, J. Y., Heo, J., Kim, D., Han, S. Z., Park, M. S. (2013). *Aronia melanocarpa* and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(1), 14–19.
- Patić A. (2018). Značaj molekularne dijagnostike u dokazivanju virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini (dissertation). Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet.
- Pienaar L., 2021. The Economic Contribution of South Africa's Pomegranate Industry. <http://www.elsenburg.com/>
- Pires, S. M. (2013). Assessing the Applicability of Currently Available Methods for Attributing Foodborne Disease to Sources, Including Food and Food Commodities. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(3), 206–213.
- Pires, S. M., Fischer-Walker, C. L., Lanata, C. F., Devleeschauwer, B., Hall, A. J., Kirk, M. D., Duarte, A. S. R., Black, R. E., Angulo, F. J. (2015). Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLOS ONE*, 10(12), e0142927.

- Platts-Mills, J. A., Liu, J., Hout, E. R. (2013). New concepts in diagnostics for infectious diarrhea. *Mucosal Immunology*, 6(5), 876–885.
- Pogan, R., Dülfer, J., Uetrecht, C. (2018). Norovirus assembly and stability. *Current Opinion in Virology*, 31, 59–65.
- Prasad, B. V. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., Estes, M. K. (1999). X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid. *Science*, 286(5438), 287–290.
- Predmore, A., Li, J. (2011). Enhanced Removal of a Human Norovirus Surrogate from Fresh Vegetables and Fruits by a Combination of Surfactants and Sanitizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4829–4838.
- Pringle, K., Lopman, B., Vega, E., Vinje, J., Parashar, U. D., Hall, A. J. (2015). Noroviruses: epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future Microbiology*, 10(1), 53–67.
- Qi, R., Ye, C., Chen, C., Yao, P., Hu, F., Lin, Q. (2015). Norovirus prevention and the prevalence of asymptomatic norovirus infection in kindergartens and primary schools in Changzhou, China: Status of the knowledge, attitudes, behaviors, and requirements. *American Journal of Infection Control*, 43(8), 833–838.
- Qu, W., Breksa III, A. P., Pan, Z., Ma, H., Mchugh, T. H. (2012). Storage Stability of Sterilized Liquid Extracts from Pomegranate Peel. *Journal of Food Science*, 77(7), C765–C772.
- Quattrucci, A., Ovidi, E., Tiezzi, A., Vinciguerra, V., Balestra, G. (2013). Biological control of tomato bacterial speck using *Punica granatum* fruit peel extract. *Crop Protection*, 46, 18–22.
- Radin, D. (2012). Human norovirus transmission due to contaminated fresh fruit and vegetables. *Archives of Biological Sciences*, 64(4), 1405–1411.
- Radin, D. (2013). Significance and molecular detection of noroviruses in fresh produce. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz. *Formatex Research Center*, 1893-1904.
- Radin, D., and D'Souza, D. H. (2011a). Evaluation of Two Primer Sets Using Newly Developed Internal Amplification Controls for Rapid Human Norovirus Detection by SYBR Green I Based Real-Time RT-PCR. *Food and Environmental Virology*, 3(2), 61–69.
- Radin, D., and D'Souza, D. H. (2011b). Simple and Rapid Detection of Human Norovirus from Produce Using SYBR Green I-based Real-time RT-PCR. *Food and Environmental Virology*, 3(3–4), 121–129.
- Rajiuddin, S. M., Vigre, H., Musavian, H. S., Kohle, S., Krebs, N., Hansen, T. B., Gantzer, C., Schultz, A. C. (2020). Inactivation of hepatitis A virus and murine norovirus on surfaces of plastic, steel and raspberries using steam-ultrasound treatment. *Food and Environmental Virology*, 12(4), 295–309.
- Ramírez-Castillo, F., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F., Harel, J., Guerrero-Barrera, A. (2015). Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*, 4(2), 307–334.
- Randazzo, W., Falcó, I., Aznar, R., Sánchez, G. (2017). Effect of green tea extract on enteric viruses and its application as natural sanitizer. *Food Microbiology*, 66, 150–156.

- Richards, G. P., Watson, M. A., Meade, G. K., Hovan, G. L., Kingsley, D. H. (2012). Resilience of Norovirus GII.4 to Freezing and Thawing: Implications for Virus Infectivity. *Food and Environmental Virology*, 4(4), 192–197.
- Richardson, C., Bargatze, R. F., Goodwin, R., Mendelman, P. M. (2013). Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Review of Vaccines*, 12(2), 155–167.
- Riddle, M. S. and Walker, R. I. (2016). Status of vaccine research and development for norovirus. *Vaccine*, 34(26), 2895–2899.
- Robilotti, E., Deresinski, S., Pinsky, B. A. (2015). Norovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 134–164.
- Robin, M., Chassaing, M., Loutreul, J., de Rougemont, A., Belliot, G., Majou, D., Gantzer, C., Boudaud, N. (2019). Effect of natural ageing and heat treatments on GII.4 norovirus binding to Histo-Blood Group Antigens. *Scientific Reports*, 9(1).
- Rönnqvist, M., Rättö, M., Tuominen, P., Salo, S., Maunula, L. (2013). Swabs as a Tool for Monitoring the Presence of Norovirus on Environmental Surfaces in the Food Industry. *Journal of Food Protection*, 76(8), 1421–1428.
- Rosenblat, M., Hayek, T., Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, 187(2), 363–371.
- Rowe G, Bolger F (2016) Final report on ‘the identification of food safety priorities using the Delphi technique’. EFSA Support Publ 13:1–139
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2016). Monitoring and improving the effectiveness of surface cleaning and disinfection. *American Journal of Infection Control*, 44(5), e69–e76.
- Saddiqe, Z., Naeem, I., Hellio, C., Patel, A. V., Abbas, G. (2020). Phytochemical profile, antioxidant and antibacterial activity of four Hypericum species from the UK. *South African Journal of Botany*, 133, 45-53.
- Salles, T. S., Meneses, M. D. F., Caldas, L. A., Sá-Guimarães, T. E., de Oliveira, D. M., Ventura, J. A., ...Ferreira, D. F. (2021). Virucidal and antiviral activities of pomegranate (*Punica granatum*) extract against the mosquito-borne Mayaro virus. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1-8.
- Samandoulgou, I., Fliss, I., Jean, J. (2021). Adhesion of Norovirus to Surfaces: Contribution of Thermodynamic and Molecular Properties Using Virus-Like Particles. *Food and Environmental Virology*, 13(3), 368–379.
- Samandoulgou, I., Hammami, R., Morales Rayas, R., Fliss, I., & Jean, J. (2015). Stability of Secondary and Tertiary Structures of Virus-Like Particles Representing Noroviruses: Effects of pH, Ionic Strength, and Temperature and Implications for Adhesion to Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7680–7686.
- Sánchez, G., Bosch, A. (2016). Survival of enteric viruses in the environment and food. *Viruses in foods*, 367-392.
- Sato, H., Yokoyama, M., Nakamura, H., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N., Noda, M., Tanaka, T., Motomura, K. (2017). Evolutionary Constraints on the Norovirus Pandemic Variant GII.4_2006b over the Five-Year Persistence in Japan. *Frontiers in Microbiology*, 08.

- Sato, J., Miki, M., Kubota, H., Hitomi, J., Tokuda, H., Todaka-Takai, R., Katayama, K. (2016). Effects of disinfectants against norovirus virus-like particles predict norovirus inactivation. *Microbiology and Immunology*, 60(9), 609–616.
- Scherer, K., Mäde, D., Ellerbroek, L., Schulenburg, J., Johne, R., Klein, G. (2009). Application of a Swab Sampling Method for the Detection of Norovirus and Rotavirus on Artificially Contaminated Food and Environmental Surfaces. *Food and Environmental Virology*, 1(1), 42–49.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026.
- Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in tomatoes). (2014). *EFSA Journal*, 12(10), 3832. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3832>
- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M. L., Lindesmith, L. C., Baric, R. S., Moe, C. L. (2011). Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6884–6888.
- Seo, K., Lee, J. E., Lim, M. Y., Ko, G. (2012). Effect of Temperature, pH, and NaCl on the Inactivation Kinetics of Murine Norovirus. *Journal of Food Protection*, 75(3), 533–540.
- Shabtay, A., Eitam, H., Tadmor, Y., Orlov, A., Meir, A., Weinberg, P., Weinberg, Z. G., Chen, Y., Brosh, A., Izhaki, I., Kerem, Z. (2008). Nutritive and Antioxidative Potential of Fresh and Stored Pomegranate Industrial Byproduct as a Novel Beef Cattle Feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10063–10070.
- Sido, R. F., Huang, R., Liu, C., Chen, H. (2017). High hydrostatic pressure inactivation of murine norovirus and human noroviruses on green onions and in salsa. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 1-6.
- Sidoti, F., Rittà, M., Costa, C., Cavallo, R. (2015). Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(06), 551–561.
- Silva, D. A. L., Camargo, A. C., Todorov, S. D., Nero, L. A. (2016). *Listeria* spp. contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to food-contact surface sanitizers. *Journal of Food Safety*, 37(2), e12313.
- Simmons, K., Gambhir, M., Leon, J., Lopman, B. (2013). Duration of Immunity to Norovirus Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1260-1267.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., Singh, N. (2018). Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chemistry*, 261, 75–86.
- Singh, P., Tripathi, M. K., Yasir, M., Khare, R., Tripathi, M. K., Shrivastava, R. (2020). Potential Inhibitors for SARS-CoV-2 and Functional Food Components as Nutritional Supplement for COVID-19: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 458–466.
- Siqueira, J. A. M., Bandeira, R. D. S., Oliveira, D. D. S., dos Santos, L. F. P., Gabbay, Y. B. (2017). Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982–2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. *PLOS ONE*, 12(6), e0178909.

- Song, M., Hossain, M. I., Jung, S., Yeo, D., Wang, Z., Min, A., Zhao, Z., Park, S., Choi, C. (2022). Comparison of virucidal efficacy of sodium hypochlorite, chlorine dioxide, peracetic acid, and ethanol against hepatitis A virus by carrier and suspension tests. *International Journal of Food Microbiology*, 363, 109506.
- Song, X., Vossebein, L., Zille, A. (2019). Efficacy of disinfectant-impregnated wipes used for surface disinfection in hospitals: a review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1).
- Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P., Azeez, J. M., Sreeharshan, S. (2014). Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *BioMed Research International*, 2014, 1-12.
- Stojanović, I., Šavikin, K., Đedović, N., Živković, J., Saksida, T., Momčilović, M., Koprivica, I., Vujičić, M., Stanisavljević, S., Miljković, O., Menković, N. (2017). Pomegranate peel extract ameliorates autoimmunity in animal models of multiple sclerosis and type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods*, 35, 522–530.
- Stover, E. (2007). Mediterranean Fruits: Ancient History and Modern Promise. *HortScience*, 42(5), 1071.
- Strong, D. W., Thackray, L. B., Smith, T. J., Virgin, H. W. (2012). Protruding Domain of Capsid Protein Is Necessary and Sufficient To Determine Murine Norovirus Replication and Pathogenesis In Vivo. *Journal of Virology*, 86(6), 2950–2958.
- Su, X., and D'Souza, D. H. (2013). Naturally Occurring Flavonoids Against Human Norovirus Surrogates. *Food and Environmental Virology*, 5(2), 97–102.
- Su, X., Sangster, M. Y., D'Souza, D. H. (2010). In Vitro Effects of Pomegranate Juice and Pomegranate Polyphenols on Foodborne Viral Surrogates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(12), 1473–1479.
- Sun, Y. M., and Ockerman, H. (2005). A review of the needs and current applications of hazard analysis and critical control point (HACCP) system in foodservice areas. *Food Control*, 16(4), 325–332.
- Sun, Y. M., Ockerman, H. (2005). A review of the needs and current applications of hazard analysis and critical control point (HACCP) system in foodservice areas. *Food Control*, 16(4), 325–332.
- Süntar, I., Oyardı, O., Akkol, E. K., Özçelik, B. (2015). Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 1065–1070.
- Suručić, R., Tubić, B., Stojiljković, M. P., Djuric, D. M., Travar, M., Grabež, M., Šavikin, K., Škrbić, R. (2020). Computational study of pomegranate peel extract polyphenols as potential inhibitors of SARS-CoV-2 virus internalization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(2), 1179–1193.
- Svensson L, Desselberger U, Estes MK, Greenberg HB. *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press; 2016.
- Tadić, V., Oliva, A., Božović, M., Cipolla, A., de Angelis, M., Vullo, V., Garzoli, S., Ragno, R. (2017). Chemical and Antimicrobial Analyses of *Sideritis romana* L. subsp. *purpurea* (Tal. ex Benth.) Heywood, an Endemic of the Western Balkan. *Molecules*, 22(9), 1395.

- Tahamtan, A., Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert review of molecular diagnostics*, 20(5), 453-454.
- Tamimi, A. H., Edmonds-Wilson, S. L., Gerba, C. P. (2015). Use of a Hand Sanitizing Wipe for Reducing Risk of Viral Illness in the Home. *Food and Environmental Virology*, 7(4), 354–358.
- Tan M, Fang PA, Xia M, Chachiyo T, Jiang W, Jiang X. Terminal modifications of norovirus P domain resulted in a new type of subviral particles, the small P particles. *Virology*. 2011;410(2):345-352.
- Tan, M., Fang, P., Chachiyo, T., Xia, M., Huang, P., Fang, Z., Jiang, W., Jiang, X. (2008). Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus–host interaction. *Virology*, 382(1), 115–123.
- Tan, M., Hegde, R. S., Jiang, X. (2004a). The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms Dimer and Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *Journal of Virology*, 78(12), 6233–6242.
- Tan, M., Hegde, R. S., Jiang, X. (2004b). The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms Dimer and Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *Journal of Virology*, 78(12), 6233–6242.
- Tárrega, M. A., Varela, P., Fromentin, E., Feuillère, N., Issaly, N., Roller, M., Sanz-Buenhombre, M., Villanueva, S., Moro, C., Guadarrama, A., Fiszman, S. (2013). Specific phenolic compounds and sensory properties of a new dealcoholized red wine with pomegranate (*Punica granatum* L.) extract. *Food Science and Technology International*, 20(6), 421–429.
- Taube S, Rubin JR, Katpally U, Smith TJ, Kendall A, Stuckey JA, Wobus CE. High-resolution x-ray structure and functional analysis of the murine norovirus 1 capsid protein protruding domain. *J Virol*. 2010;84(11):5695–5705
- Terakami, S., Matsuta, N., Yamamoto, T., Sugaya, S., Gemma, H., Soejima, J. (2007). Agrobacterium-mediated transformation of the dwarf pomegranate (*Punica granatum* L. var. nana). *Plant Cell Reports*, 26(8), 1243–1251.
- Terio, V., Bottaro, M., Pavoni, E., Losio, M., Serraino, A., Giacometti, F., Martella, V., Mottola, A., di Pinto, A., & Tantillo, G. (2017). Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 61–65.
- Thomson PDR, Montvale, NJ. Physicians' Desk Reference® (PDR) for Herbal Medicines (2004) 3rd ed., 605-606
- Thongprachum, A., Khamrin, P., Maneekarn, N., Hayakawa, S., Ushijima, H. (2015). Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality, and outbreak. *Journal of Medical Virology*, 88(4), 551–570.
- Thorne, L. G., and Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, 95(2), 278–291.
- Tian, P., Yang, D., Shan, L., Wang, D., Li, Q., Gorski, L., Lee, B. G., Quiñones, B., Cooley, M. B. (2017). Concurrent Detection of Human Norovirus and Bacterial Pathogens in Water Samples from an Agricultural Region in Central California Coast. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Tocci, N., Gaid, M., Kaftan, F., Belkheir, A. K., Belhadj, I., Liu, B., ... Beerhues, L. (2018). Exodermis and endodermis are the sites of xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* roots. *new phytologist*, 217(3), 1099-1112.

Tohma, K., Saito, M., Mayta, H., Zimic, M., Lepore, C. J., Ford-Siltz, L. A., Gilman, R. H., Parra, G. I. (2018). Complete Genome Sequence of a Nontypeable GII Norovirus Detected in Peru. *Genome Announcements*, 6(10).

Tortorello, M. L. (2003). Indicator Organisms for Safety and Quality—Uses and Methods for Detection: Minireview. *Journal of AOAC International*, 86(6), 1208–1217.

Trudel-Ferland, M., Jubinville, E., Jean, J. (2021). Persistence of Hepatitis A Virus RNA in Water, on Non-porous Surfaces, and on Blueberries. *Frontiers in Microbiology*, 12.

Tuladhar, E., Hazeleger, W., Koopmans, M., Zwietering, M., Duizer, E., Beumer, R. (2015). Reducing viral contamination from finger pads: handwashing is more effective than alcohol-based hand disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 90(3), 226–234.

Tung, G., Macinga, D., Arbogast, J., Jaykus, L. A. (2013). Efficacy of Commonly Used Disinfectants for Inactivation of Human Noroviruses and Their Surrogates. *Journal of Food Protection*, 76(7), 1210–1217.

Tung-Thompson, G., Gentry-Shields, J., Fraser, A., Jaykus, L. A. (2014). Persistence of Human Norovirus RT-qPCR Signals in Simulated Gastric Fluid. *Food and Environmental Virology*, 7(1), 32–40.

Tung-Thompson, G., Gentry-Shields, J., Fraser, A., Jaykus, L. A. (2014). Persistence of Human Norovirus RT-qPCR Signals in Simulated Gastric Fluid. *Food and Environmental Virology*, 7(1), 32–40.

Turner, D. E., Daugherty, E. K., Altier, C., Maurer, K. J. (2010). Efficacy and limitations of an ATP-based monitoring system. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 49(2), 190–195.

Turrini, E., Ferruzzi, L., Fimognari, C. (2015). Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–19.

U.S. Environmental Protection Agency. 2009. List G. EPA's registered antimicrobial products effective against norovirus (norwalk-like virus). Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. <https://www.epa.gov/pesticide-registration/list-g-epas-registered-antimicrobial-products-effective-against-norovirus>

U.S. Food and Drug Administration. (2021). The Current Food Allergen Landscape. <https://www.fda.gov/food/conversations-experts-food-topics/current-food-allergen-landscape>

United States Environmental Protection Agency (2016a). *Confirmatory Virucidal Effectiveness Test Using Feline Calicivirus as Surrogate for Norovirus*. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fcv2_confirm_surf_pcol.pdf

United States Environmental Protection Agency (2016b). *List G: EPA Registered Hospital Disinfectants Effective against Norovirus (Norwalk-like virus)* https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-06/documents/list_g_norovirus.pdf

United States Environmental Protection Agency (2018) List G: EPA's registered antimicrobial products effective against norovirus (Norwalk-like virus). https://www.epa.gov/sites/production/files/201804/documents/list_g_disinfectant_list_3_15_18.pdf.

van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D. J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., di Bartolo, I., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., . . . Koopmans, M. P. G. (2018). Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(5), 545–553.

Van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D. J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., Di Bartolo, I., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., . . . Koopmans, M. P. G. (2018). Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(5), 545–553.

Ventura, J., Alarcón-Aguilar, F., Roman-Ramos, R., Campos-Sepulveda, E., Reyes-Vega, M. L., Daniel Boone-Villa, V., Jasso-Villagómez, E. I., Aguilar, C. N. (2013). Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. *Food Chemistry*, 136(1), 109–115.

Verhaelen, K., Bouwknecht, M., Carratalà, A., Lodder-Verschoor, F., Diez-Valcarce, M., Rodríguez-Lázaro, D., de Roda Husman, A. M., Rutjes, S. A. (2013). Virus transfer proportions between gloved fingertips, soft berries, and lettuce, and associated health risks. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 419–425.

Verhaelen, K., Bouwknecht, M., Lodder-Verschoor, F., Rutjes, S. A., & de Roda Husman, A. M. (2012). Persistence of human norovirus GII.4 and GI.4, murine norovirus, and human adenovirus on soft berries as compared with PBS at commonly applied storage conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 137–144.

Vermaak, I., Viljoen, A., Hamman, J., van Vuuren, S. (2009). The effect of simulated gastrointestinal conditions on the antimicrobial activity and chemical composition of indigenous South African plant extracts. *South African Journal of Botany*, 75(3), 594–599.

Viator, R., Gray, R. L., Sarver, R., Steiner, B., Mozola, M., Rice, J. (2017). Validation of the AccuPoint Advanced ATP Hygiene Monitoring System for Sanitation Monitoring Through Detection of ATP from Stainless Steel Surfaces. *Journal of Aoac International*, 100(2), 537–547.

Vinje, J. (2014). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 373–381.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, 44(5), 1217–1223.

Waite, J., Daeschel, M. (2007). Contribution of Wine Components to Inactivation of Food-Borne Pathogens. *Journal of Food Science*, 72(7), M286–M291.

Wasila, H., Li, X., Liu, L., Ahmad, I., Ahmad, S. (2013). Peel Effects on Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and Making of Pomegranate Juice and Wine. *Journal of Food Science*, 78(8), C1166–C1172.

- Waterman, P. G., Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific.
- Watson, S., Gong, Y. Y. (2018). Risk behaviours and practices of food handlers in norovirus transmission. *British Food Journal*, 120(11), 2510–2523.
- Whitehead, K., McCue, K. A. (2010). Virucidal efficacy of disinfectant actives against feline calicivirus, a surrogate for norovirus, in a short contact time. *American Journal of Infection Control*, 38(1), 26–30.
- Whitehead, K., Smith, L., Verran, J. (2008). The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods: UV illumination and ATP bioluminescence. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), 121–128.
- Whiteley, G. S., Glasbey, T. O., Fahey, P. P. (2016). A suggested sampling algorithm for use with ATP testing in cleanliness measurement. *Infection, Disease & Health*, 21(4), 169–175.
- Williams, G. J., Denyer, S. P., Hosein, I. K., Hill, D. W., Maillard, J. Y. (2007). The development of a new three-step protocol to determine the efficacy of disinfectant wipes on surfaces contaminated with *Staphylococcus aureus*. *The Journal of hospital infection*, 67(4), 329–335.
- World Health Organization, WHO. (2006). Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Disease. Five keys to safer food manual https://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf
- World Health Organization , (2009) WHO Monographs on Selected Plants, Vol 4., 108–116.
- Wu, H. M., Fornek, M., Schwab, K. J., Chapin, A. R., Gibson, K., Schwab, E., Spencer, C., & Henning, K. (2005). A Norovirus Outbreak at a Long-Term-Care Facility: The Role of Environmental Surface Contamination. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 26(10), 802–810.
- Wu, J., Long, S. C., Das, D., Dorner, S. M. (2011). Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *Journal of Water and Health*, 9(2), 265–278.
- Xiang, X., Qiu, D., Hegele, R. D., Tan, W. C. (2001). Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum. *Journal of Virological Methods*, 94(1–2), 129–135.
- Yan, R., Wang, Y., Duncan, T. V., Shieh, Y. C. (2020). Effect of polymer and glass physicochemical properties on MS2 recovery from food contact surfaces. *Food microbiology*, 87, 103354.
- Yang, Y., Xiu, J., Liu, J., Zhang, L., Li, X., Xu, Y., Qin, C., Zhang, L. (2013). Chebulagic Acid, a Hydrolyzable Tannin, Exhibited Antiviral Activity *In Vitro* and *In Vivo* against Human Enterovirus 71. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9618–9627.
- Yang, Z., Chambers, H., DiCaprio, E., Gao, G., Li, J. (2018). Internalization and dissemination of human norovirus and Tulane virus in fresh produce is plant dependent. *Food microbiology*, 69, 25–32.
- Yeargin, T., Fraser, A., Huang, G., Jiang, X. (2015). Recovery and Disinfection of Two Human Norovirus Surrogates, Feline Calicivirus and Murine Norovirus, from Hard Nonporous and Soft Porous Surfaces. *Journal of Food Protection*, 78(10), 1842–1850.

Yiğit Hanoğlu, D., Hanoğlu, A., Güvenir, M., Süer, K., Demirci, B., Başer, K. H. C., Özkum Yavuz, D. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Sideritis cypria* Post endemic in Northern Cyprus. *Journal of Essential Oil Research*, 29(3), 228–232.

Zahorsky, J. (1929). Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr*, 46, 391-395.

Zalán, Z. (Ed.). (2015). Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality Taylor T.M. Cambridge, UK, Waltham, USA, Kidlington, UK Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier 2015 ISBN 978-1-78242-034-7, 412 pages. *Acta Alimentaria*, 44(2), 316–319.

Zarei, M., Azizi, M., Bashiri-Sa, Z. (2010). Studies on Physico-Chemical Properties and Bioactive Compounds of Six Pomegranate Cultivars Grown in Iran. *Journal of Food Technology*, 8(3), 112–117.

Zhang, C., Zhao, X. H., Yang, L., Chen, X. Y., Jiang, R. S., Jin, S. H., Geng, Z. Y. (2017). Resveratrol alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, microflora, and barrier integrity in broilers. *Poultry Science*, 96(12), 4325–4332.

Zhang, W., Xue, J., Ge, M., Yu, M., Liu, L., Zhang, Z. (2013). Resveratrol attenuates hepatotoxicity of rats exposed to arsenic trioxide. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 87–92.

Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., Monroe, S. S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346(2), 312–323.

Zonta, W., Mauroy, A., Farnir, F., Thiry, E. (2015). Comparative Virucidal Efficacy of Seven Disinfectants Against Murine Norovirus and Feline Calicivirus, Surrogates of Human Norovirus. *Food and Environmental Virology*, 8(1), 1–12.

Zukovskij, P.M. (1950). Punica. In: State Publishing House Soviet Science, Moscow, 60-61.

Živković I, Šavikin K, Zdunić G, Živković J, Bigović D, Menković N, Radin D (2018) Antiviral activity of medicinal plants extracts against food-borne norovirus. *Lekovite Sirovine* 38:1-4.

Živković, I., Šavikin, K., Živković, J., Zdunić, G., Janković, T., Lazić, D., Radin, D. (2021). Antiviral Effects of Pomegranate Peel Extracts on Human Norovirus in Food Models and Simulated Gastrointestinal Fluids. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(2), 203–209.

BIOGRAFIJA AUTORA

Ivana Živković, rođena je 25.08.1990. godine u Beogradu, Republika Srbija. Osnovne studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Republika Srbija, studijski program Prehrambena tehnologija, modul Upravljanje bezbednošću i kvalitetom u proizvodnji hranom, završila je 18.09.2013.god. Master studije na istom fakultetu, studijski program Prehrambena tehnologija završila je 17.10.2014.god, odbranom master rada pod nazivom: „Mikrobiološki kvalitet i bezbednost sladoleda“ sa prosečnom ocenom 9,43. Doktorske akademske studije, na istom fakultetu, studijski program Prehrambena tehnologija, upisala je 2014 godine i položila je sve predviđene ispite planom i programom sa prosečnom ocenom 9,71. Ivana Živković je angažovana za izvođenje praktične nastave od školske 2015/2016 do 2019/2020 na predmetima: Mikrobiologija hrane, Genetika industrijskih mikroorganizama, Opšta mikrobiologija i Mikrobiologija. Učestvovala je na nacionalnim i međunarodnim konferencijama, a na FOOD-3 International conference “The challenges for quality and safety along the food chain”, Bugarska osvojila je drugo mesto za najbolji poster sa prezentacijom. Autor je rada u saradnji sa kolegama pod naslovom “Antiviral Effects of Pomegranate Peel Extracts on Human Norovirus in Food Models and Simulated Gastrointestinal Fluids” objavljenog u časopisu vrhunskog međunarodnog značaja. Autor je i tri rada u časopisima sa međunarodnim značajem i osam saopštenja objavljenih na domaćim i međunarodnim skupovima. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Ивана Живковић _____

Број индекса _____ ТХ 14/023 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни antivirusни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Живковић

Број индекса ТХ 14/023

Студијски програм Прехрамбена Технологија

Наслов рада Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни antivirusни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*

Ментор проф. др. Драгослава Радин

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Екстракт коре нара (*Punica granatum* L.) као природни antivirusни агенс за редукцију хуманих норовируса *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.