

ttelgiene. 55, 4-7

Mioković, B. B. Njari, L. Kozačinski, N. Zdoec (2004a): Utjecaj postupka uzorkovanja na mikrobiološku ispravnost namirnica

animalnog podrijetla, Meso VI (6), 46-50

Murray, K.A., A. Gilmour, R.H. Madden (2001): Microbiological quality of chilled beef carcasses in northern Ireland: A baseline sur-

vey. J. Food Prot. 64 (4), 498-502.

Zaprimljeno 23.2.2010.
Prihvaćeno 10.5.2010.

m

Food sampling and the surface for microbiological analysis

Summary

Results of microbiological analyses depend on methods of sampling, preparing, storing, transport, delivery and analyzing of samples. The frequency of food sampling and surfaces which come in contact with food during processing and preparing are determined within a self-control frame which needs to be established by food business operators. Competent authorities in charge for carrying out official control must control whether food business operators have made and if they apply the plans of self-control and analyses, and suitable measures in a case of unsatisfying results of microbiological research. Responsibility for the health safety of products that appear on the market is put upon the producers in that way.

Key words: sampling, microbiological analyses, food business operator, official controls

Musterprobenprozess von Nahrung und Flächen für mikrobielle Untersuchung

Zusammenfassung

Die Resultate der mikrobiellen Untersuchungen hängen von der Art der Abhebung, Vorbereitung, Unterbringung, Beförderung und Untersuchung der Muster ab. Die Häufigkeit des Musterprobenprozesses von Nahrung und Flächen, die während der Verarbeitung und Vorbereitung in Berührung mit Nahrung kommen, ist im Rahmen der Selbstkontrolle bestimmt, die die Subjekte in Nahrungsgeschäften (food business operators) verwirklichen sollen. Die zuständige Institution für die Durchführung der offiziellen Kontrolle soll prüfen, ob das Subjekt in Nahrungsgeschäften die Pläne der Selbstkontrolle und des Prüfens verfasst hat und ob es sie verwendet, sowie ob das Subjekt die notwendigen Maßnahmen im Falle der unzufriedenstellenden Resultate der mikrobiellen Untersuchungen trifft. Auf diese Weise werden die Hersteller verantwortlich für die gesundheitliche Richtigkeit der Nahrung, die ihrerseits auf den Markt placiert wird.

Schlüsselwörter: Musterprobenprozess (Sampled), mikrobielle Untersuchungen, Subjekt in Nahrungsgeschäften (food business operators), offizielle Kontrollen

Il campionamento delle sostanze alimentari e la superficie per una ricerca microbiologica

Sommario

I risultati delle ricerche microbiologiche dipendono dalla maniera in cui i campioni vengono presi, preparati, depositati, trasportati ed esaminati. La frequenza di campionatura di alimenti e delle superfici che vengono in contatto con gli alimenti durante il processo di lavorazione e preparazione è determinata nell'ambito di autocontrollo che deve essere stabilito dai soggetti impiegati nell'industria alimentare (food business operators). Un organo presupposto ad eseguire un controllo ufficiale deve controllare se un soggetto incluso nel food business ha fatto i progetti di autocontrollo e di esame, e se li applica. Lo stesso organo deve anche controllare se ci sono dei mezzi di controllo se i risultati di ricerca microbiologica si dimostrano non soddisfacenti. In tal modo i produttori vengono costretti ad una responsabilità della sicurezza alimentare di prodotti che escono al mercato.

Parole chiave: campionamento, ricerca microbiologica, soggetto impiegato nell'industria alimentare (food business operators), controlli ufficiali



Norovirusi u školjkašima kao akutni problem današnjice

Škoko¹, I., E. Listeš¹, I. Listeš¹, L. Kozačinski²

Stručni pregled

Sažetak

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

Ključne riječi: školjkaši, norovirus, gastroenteritis

Uvod

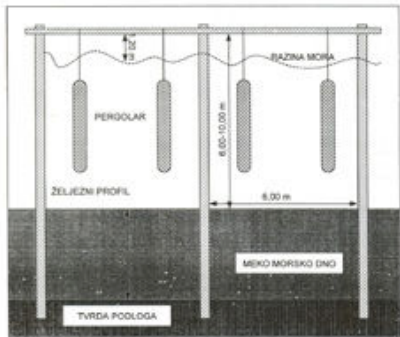
More, odnosno organizmi koji žive u morskoj sredini imaju veliko značenje u prehrani ljudi, napose u današnje vrijeme isticanja važnosti zdrave prehrane. Uzgoj morskih organizama duž jadranske obale ima dugu tradiciju koja datira još iz 19. stoljeća (Skaramuca i sur., 1997). Znanje stečeno dugogodišnjim radom na uzgoju školjakaša i riba, omogućilo je razvoj marikulture, kakva je danas. Od školjkaša se za ljudsku prehranu prvenstveno uzgajaju dagnje, kamenice, i školjke iz porodice *Aracidae*. Iz prirodnih se staništa najčešće iskorištavaju kunjka *Arca noae*, prnjavica, *Venus verrucosa*, bijela dagnja, *Modiolus barbatus*, kopito *Spondylus gaedoropus*, jakopska kapica, *Pecten jacobaeus* i unatoč zakonskim zabranama, prstac *Litopha-*

ga lithopaga, te plemenita periska, *Pinna nobilis* (Bratoš i sur., 2004). Ishrana školjakaša i njihov rast su ovisni o određenim količinama i vrstama algi, populaciji fitoplanktona, kojima se hrane. Za uspješno uzgajanje školjakaša potrebni su specifični geomorfološki, abiotski i biotski uvjeti sredine. Najprikladniji su veći zaljevci sa suženim ulazom i plići kanali u kojima se vodene mase za vrijeme plime ponovno vraćaju natrag u more, zajedno s larvama školjakaša (Matulić, 2005). Uzgoj školjakaša se može podijeliti u dvije faze. U prvom dijelu života, ličinke školjakaša pripadaju planktonskoj zajednici, dok je odrasla školjka tipični bentosni organizam, tako da je prva faza prikupljanje mladih školjakaša, a druga je uzgoj do konzumne veličine. Količina školjakaša u komerci-

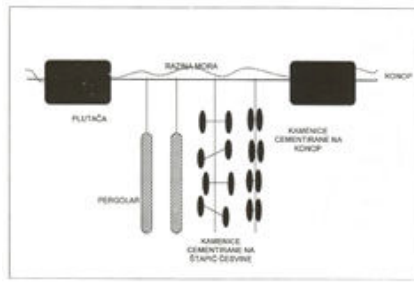
jalnom uzgoju primarno je određena količinom sakupljenog mlada. Mlad dagnji se prikuplja rahlo ispletenim konopom postavljenim vodoravno između stupova parkova ili plutača. Nasadažu se u mrežasta najlonska crijeva za uzgoj do konzumne veličine, dok se za prikupljanje mladih kamenica upotrebljavaju snopovi grančica vezanih zajedno najlonskim konopom ili plastičnim pločicama crne, pa se prikupljene kamenice nasadažu cementiranjem na konop ili se direktno nasadažu u kutije za uzgoj kamenica. Na kraju 16-mjesečnog ciklusa proizvodnje dagnje narastu do veličine 5-7 cm, kada su spremne za tržište prema Pravilniku o tržišnim standardima određenih proizvoda ribarstva (Anonim., 2009b). Na slici 1. je shematski prikaz fiksnog parka za uzgoj školjaka-

¹ Ines Škoko, dr.vet.med., dr. sc. Eddy Listeš, dr.vet.med., Irena Listeš, dr.vet.med.; Hrvatski Veterinarski Institut, Podružnica Veterinarski Zavod Split, Laboratorij za mikrobiologiju hrane, Poljička cesta 33, Split, e-mail: i.skoko.vzs@veinst.hr

² dr. sc. Lidija Kozačinski, izvanredni profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu., Zavod za higijenu i thenologiju animiranih namirnica, Heinzelova 55, Zagreb



Slika 1. Shema fiksnog parka za uzgoj školjkaša, preuzeto
Figure 1 Scheme of a fixed park for the cultivation of bivalve shellfish



Slika 2. Shema plutajućeg parka za uzgoj dagnji i kamenica, preuzeto
Figure 2 Scheme of the floating park for the cultivation of mussels and oysters

ša, dok je na slici 2. shematski prikaz plutajućeg parka za uzgoj dagnji i kamenica. Temperatura morske vode važna je za intenzitet ishrane, a ima i značajan utjecaj na spolnu aktivnost. Temperatura tijekom ljeta najmanje 18°C je neophodna za proizvodnju mladi i za rast školjkaša koji je skoro dva puta brži u predjelima s blagom klimom (Matulić, 2005). Lokacija za uzgoj zakonski se određuje prostornim planovima na temelju biofizičkih karakteristika i kriterija potrebne i podupirajuće infrastrukture.

Patogeni iz školjkaša

Bolesti školjkaša mogu biti uzrokovane različitim uzročnicima (virusi, bakterije, nametnici) te zbog nemogućnosti i/ili neispravnosti liječenja dovode do velikih gubitaka uzgajanih organizama ili mogu u potpunosti uništiti uzgoj na većem području. U Hrvatskoj su bolesti školjkaša i njihovo suzbijanje predmet Zakona o veterinarstvu (Anonim., 2007a), na temelju kojeg se donosi Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini (Anonim., 2010) prema kojoj se školjkaši pretražuju na prisustvo uzročnika martelioze i bonamioze. Osim velike koristi koju organizmi što žive u vodenom sredini pružaju čovjeku, oni su i re-

alna opasnost za zdravlje ljudi, zbog prenosa bolesti sa školjkaša na ljude i to najčešće slabo termički obrađenim proizvodima ili naknadnom kontaminacijom. Higijenski neispravne za javnu potrošnju su školjke koje su uginule, kojima su ljuštore otvorene, a na dodir se ne zatvaraju, koje potječu iz zagađenih voda, koje nisu dobro očišćene od obraštaja i imaju nesvojestven miris, te koje sadrže biotoksine i koje ne odgovaraju odredbama o količini pesticida i drugih otrovnih tvari, te kontaminirane radionuklidima (Mašić, 2004).

Patogeni i drugi mikroorganizmi ulaze u morski okoliš u prvom redu kroz ispuste gradskih otpadnih voda, pa je u većini područja mikrobiološka onečišćenost izravna posljedica ispuštanja nepročišćenih ili djelomično pročišćenih otpadnih voda u more. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2004) od ukupnih otpadnih voda, samo 14% prođe određeni oblik obrade prije ispuštanja (Krstulović i Šolić, 1997). Bivalvne školjke filtriraju velike količine vode da bi se prehranile, te na takav način bioakumuliraju različite patogene porijeklom iz ljudskog fecesa. Usvajanjem europske regulative (EU regulation 91/492/EC) koja propisuje prihvatljive količine bakterijskih

patogena, znatno se smanjio utjecaj bakterija na izbjivanje gastroenteritisa, ali ne i bolesti izazvane viralnim uzročnicima (Le Guyader i sur., 2009). U Hrvatskoj se svake godine donosi Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša za 2009. godinu (Anonim., 2009c), na temelju kojeg se određuju točke monitoringa proizvodnih područja, područja za ponovno polaganje školjkaša, odnosno uzgajališta školjkaša, zatim obuhvaća kontrolu morske vode i mesa školjkaša radi provjere njihove mikrobiološke kvalitete i postojanje biotoksina i štetnih kemijskih tvari u tkivu. Na temelju Pravilnika o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjkaša (Anonim., 2009a) propisuje se postupak razvrstavanja preliminarnih proizvodnih područja živih školjkaša u mikrobiološke razrede, te sukladno tome se određuje da li školjkaši idu na tržište ili u purifikacijske centre na pročišćavanje, te potom na tržište. Pravilnikom o veterinarsko - zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjaka (Anonim., 2004) se propisuje da otpremni centri za pročišćavanje školjkaša moraju imati i program određivanja vlastitih kritičnih točaka zagađe-

nja, koji se sastoji od sustava analize opasnosti i kontrole kritičnih točaka – HACCP i standardnih sanitacijskih operativnih postupaka – SSOP. Među najvažnije bakterijske patogene koji dolaze u morskoj vodi, a filtriranjem vode, odnosno hranjenjem školjkaša, se nakupljaju, ubrajaju se rodovi *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, te velik broj streptokoka (Krstulović i Šolić, 1997). U Hrvatskoj su Pravilnikom o higijeni hrane životinjskog podrijetla (Anonimno, 2007b) određena tri metabolička produkta morskih fitoplanktona/ dinoflagelata kojima se školjkaši hrane i koja se bez vidljivih promjena za školjkaše mogu prikupljati u njima, a opasna su za ljudsko zdravlje, i to *Paralytic shellfish poisoning* (PSP), *Diarrhoeic shellfish poisoning* (DSP) i *Amnesic shellfish poisoning* (ASP). Osim navedenih, u svijetu su poznati i drugi spomenuti u kratkim crtama, kao i ostali oblici otrovanja toksinima fitoplanktonskih algi, odnosno *Neurotoxic shellfish poisoning* (NSP) (Čadež i Teskeredžić, 2005).

Uloga školjkaša kao prenosilaca virusa koji uzrokuju bolesti u ljudi dobro je poznata, a epidemiološki je dokazano da se u viruse koje mogu prenijeti školjkaši ubrajaju virus hepatitisa A (HAV) i E, Norovirus (NoV), Snow-Mountagent, astrovirusi, Coxsackie-virusi te mali okrugli virusi (Krstulović i Šolić, 1997). Opasnost se povećava konzumiranjem sirovih ili toplinski nedovoljno obrađenih namirnica, a problem je činjenica da namirnice u većini slučajeva nisu organoleptički promijenjene (Kurtović i sur., 2001). NoV i HAV se trenutno smatraju jednim od najvažnijih patogena iz hrane, u zapadnom svijetu, s obzirom na broj oboljelih i na broj izbijanja bolesti do koje dolazi nakon konzumacije kontaminirane hrane, a nakon infekcije moguće je širenje bolesti i fekalno-oralnim putem (Koopmans i Duizer, 2004). Izbijanja bolesti

izazvane na ovaj način uključuju veliki broj ljudi i mogu se proširiti na veće područje. Inkubacija NoV traje 24 do 48 sati, a klinički simptomi bolesti su karakterizirani povraćanjem, u 84,5% slučajeva, vodenim proljevom (53,4% slučajeva), boli u trbuhu (47,6% slučajeva), laganom temperaturom (16,5% slučajeva), glavoboljom i bolovima u mišićima (Prato i sur., 2004).

Bolest je uglavnom blagog toka, simptomi prolaze u 2–3 dana, a teži se slučajevi mogu pojaviti u kroničnih bolesnika. Nije uočena razlika u kliničkim simptomima što se tiče spola, dok je znatno veći broj jakih proljeva bio kod starijih osoba, što nije bio slučaj s drugim simptomima (Prato i sur., 2004). Do viralne kontaminacije hrane može doći u svim fazama procesa proizvodnje od farme do stola, pa tako i pri samoj manipulaciji s hranom od strane osoba koje su inficirane, a ta hrana nije nakon manipulacije termički obrađena. Naglasak bi trebao biti na strogoj osobnoj higijeni osoblja tijekom pripreme hrane (Koopmans i Duizer, 2004).

O Norovirusu

Norovirus (NoV, prije „Norwalk-like virus“) spada u porodicu *Caliciviridae*, te čini jedan od četiri roda (Rizzo i sur., 2007). NoV je mali okrugli virion, 27–35 nm u promjeru, s jednolančanim pozitivno orijentiranim RNA genom od 7400–7700nt. Genom NoV se sastoji od tri „open reading frames“ (ORFs). ORF1 kodira ne strukturalne proteine, uključujući NTPaze, proteaze i RNA-ovisne RNA polimeraze (RdRp). ORF2 kodira najveće kapsidni protein od 58–60kDa i preklapa 3' kraj ORF1 od 17–20bp, ovisno o genogrupi. ORF3 kodira najmanji kapsidni protein od 22–29kDa (Rowena i sur., 2007). NoV je podijeljen u pet genogrupa (GI–GV), ali za GI, GII i GIV je poznato da izazivaju bolest u ljudi, s tim da je GII povezan s akutnim gastroenteritisom u odraslih (Rowena i sur., 2007). Sekvencioniranjem regije kapsidnog gena i u nekim slučajevima

ma spoja ORF1 i ORF2, identificirano je nekoliko rekombinanti NoV. GGIIb virus je izoliran prvi put u Francuskoj 2000, a zatim se proširio po Francuskoj i Europi tijekom sljedeće zime (Ambert-Balay, 2005). NoV pokazuje različite razine otpornosti prema različitim temperaturama i dezinficijensima, međutim uništava se pri 100°C (Koopmans i Duizer, 2004). Infektivna doza je 7–10 virusnih čestica, izlučivanje virusa u stolici nakon preboljenja je 3–14 dana, što je važno za osobe koje rade s hranom, NoV podnosi relativno visoku koncentraciju klora, do 10ppm klora, podnosi temperaturu zamrzavanja i zagrijavanja do 60°C, što sve olakšava širenje virusa putem vode i hrane (Valić, 2005).

Epidemiološki podaci

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

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

Dijagnostika NoV

Brza i točna dijagnoza je važna kod izbijanja bolesti, kako bi se spriječilo daljnje širenje virusa u populaciji. U zadnjih 15 godina opisano je mnogo metoda za izolaciju patogena iz školjaka. Stare metode detekcije poput elektronske mikroskopije su zamijenjene reverznom transkripcijom RT-PCR i od nedavno imunoenzimskim testovima (Bull i sur., 2006). Imunoenzimski testovi su brži i zahtijevaju manje rada od RT-PCR, ali provedene evaluacije komercijalno dostupnih kitova su pokazale nisku osjetljivost i nemogućnost detekcije svih NoV GII genotipova. Bull i sur. (2006) razvili su metodu nested RT-PCR (nRT-PCR) za detekciju NoV GII. Metoda je korištena za determinaciju genetičke različitosti cirkulirajućih sojeva u slučajevima gastroenteritisa između 1997 i 2004 (Bull i sur., 2006). Točna dijagnostika viralnih gastroenteritisa je osnovna da bi se spriječilo širenje virusa u populaciji. U Hrvatskoj je 2004 uvedena EIA metoda i radi je Hrvatski zavod za javno zdravstvo – Služba za virologiju, za detekciju kapsidalnog NoV virusnog antigena iz stolice oboljelih ili u povraćanom sadržaju, najbolje iz akutne faze, 48-72 sata od početka bolesti (Valić, 2005). Moguće je spriječiti daljnje širenje virusa koji su prisutni u zajednici, kod asimptomatskih slučajeva NoV kod pacijenata ili osoblja bolnice, strogim mjerama zaštite od cross-infekcije (Gallimore i sur., 2004). U Sjedinjenim Državama svake godine otprilike 5000 slučajeva smrtni se veže uz gastrointestinalne bolesti nepoznate etiologije (Mead i sur., 1999). U Floridi 1995, došlo je do velikog izbijanja gastroenteritisa uzrokovano konzumacijom kamenica, s tim da je 67% ljudi jelo samo terne mičke obrađene kamenice, ali unatoč tome došlo je do razvoja bolesti isto kao kod ljudi koji su jeli sirove kamenice, tako da se ne može s sigurnošću tvrditi da se kuhanjem moguće zaštititi (McDonnell i sur., 1997). Unatoč odsutnosti tretmana za viralne gastroenteritise, identifikacija uzročnika

osobito u slučaju izbijanja bolesti je važna jer omogućuje mjere opreza za sprječavanje daljnje širenja uzročnika i bolesti. Bitno je i razlikovanje od bakterijskih ili parazitskih uzročnika jer je kod tih slučajeva tretman moguć (Bull i sur., 2006). Zbog nemogućnosti uzgoja NoV in vitro i zbog njegovog raznolikog genoma, teško je razviti osjetljivu metodu detekcije. Uočeno je da NoV GII-4 dominira kod izbijanja bolesti u bolnicama i sličnim ustanovama, dok je rijedak kao uzročnik gastroenteritisa izazvanih putem kamenica ili vodom, bez obzira što stalno cirkulira u populaciji (Bon i sur., 2005). Poseban problem u tom smislu predstavljaju zatvoreni kolektivi (bolnice, domovi za stare osobe, kampovi, brodovi) gdje epidemija može započeti kao alimentarna zbog zajedničke ekspozicije nekoj fekalno-kontaminiranoj hrani, da bi se kasnije širila kontaktom na ostale članove grupe. Genogrupa GI je detektirana kod većine slučajeva gastroenteritisa izazvanih vanjskim faktorima (Bon i sur., 2005). Genogrupa GI ima više od očekivanog prevalenciju u okolišu, moguće zbog veće otpornosti prema inaktivaciji ili zbog specifičnog vezanja s tkivom kamenica (Le Guyader i sur., 2009). Nekoliko je sojeva virusa pronađeno kod infekcija izazvanih kamenicama ili vodom, dok je samo jedan soj izoliran kod prijenosa bolesti s osobe na osobu. NoV GII dominira kod sporadičnih slučajeva pacijenata ispod 15 godina starosti, dok je GI češći kod starijih pacijenata (Bon i sur., 2005). Tijekom 12 mjesječnog istraživanja Nordgren i sur. (2009), utvrdili su veću koncentraciju NoV GI u ljetnim mjesecima, a NoV GII u zimskim mjesecima, kako je i bilo za očekivati. Kod detekcije NoV iz školjaka četiri su osnovna problema; niski nivo virusne kontaminacije, velika varijabilnost virusa, prisustvo interferirajućih supstanci koje inhibiraju molekularnu detekciju i genetska varijabilnost NoV (Le Guyader i sur., 2009). Dva su koraka uključena detekcije enterovirusa iz kontaminiranih školjki: 1. izdavanje i

koncentracija virusa iz tkiva školjaka, 2. detekcija virusa uz pomoć RT-PCR metode. Uspješnost PCR-a ovisi o efikasnosti izdavanja virusa i o uklanjanju inhibirajućih faktora prisutnih u školjkama, što je osobito važno kod niskih nivoa kontaminacije školjaka (Shieh i sur., 2000). Kod školjaka najveća koncentracija humanih enterovirusa je uočena u hepatopankreasu, te je upravo zbog toga to ciljno tkivo za pretragu, a prednost je u lakšoj pripremi uzorka, povećanoj osjetljivosti testa i smanjenom interferencijom s RT-PCR (Schwab i sur., 1998). Le Guyader i sur. (2009) razvili su metodu u kojoj nukleinske kiseline ekstrahiraju uz pomoć Proteinase K, a kao kontrolu efikasnosti ekstrakcije koriste mengovirus, jer je teško moguće da će on prirodno kontaminirati školjake, a uzgaja se na kulturama stanica i uspješno se ekstrahira kao i NoV GI i GII (Le Guyader i sur., 2009). U Europi, European Committee on Normalisation (CEN), je osnovao radnu grupu stručnjaka (CEN/TC 275/WG6/TAG4), za razvoj horizontalne metode za detekciju NoV i HAV u hrani RT-PCR, uključujući školjake.

Prevenција

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

Umjesto zaključka

Kontaminacija humanim enterovirusima je prepoznata kao vrlo važan rizik vezan uz konzumaciju školjaka. Procjena rizika se za sada uglavnom zasniva na kontroli školjaka na prisutnost *E. Coli*, kao indikatoru fekalne kontaminacije. Na temelju Pravilnika o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjaka (Anonimno, 2009a) propisuje se postupak razvrstavanja preliminarnih proizvodnih područja živih školjaka u mikrobiološke razrede, te sukladno tome se određuje da li školjkaši idu na tržište ili u purifikacijske centre na pročišćavanje, te potom na tržište. Puštanje školjaka u prodaju nakon purifikacije može biti problem zbog mogućeg nakupljanja NoV u njima, bez pouzdanih dokaza o eliminaciji samih virusa. Nakon konzumacije kontaminiranih školjaka, epidemija se širi dalje fekalno-oralnim putem, iako do prijenosa bolesti može doći i direktnim kontaktom s osobe na osobu, ili viralnim česticama u aerosolu (Prato i sur., 2004). Potrebno se fokusirati na NoV u školjkašima jer školjkaši mogu služiti kao prijenosnici bolesti, kriteriji mikrobiološke kontrole nisu dovoljno validirani da bi bili sigurni u prisustvo ili odsustvo virusa, školjkaši isto tako mogu biti kontaminirani i različitim virusima, te to može dovesti do rekombinacije sojeva NoV u populaciji, također trgovinom školjkašima može doći do širenja novih virusa. Kako školjkaši filtracijom koncentriraju sve viruse tako NoV može biti i indikator prisustva i drugih virusa, produljene inkubacije i kod asimptomatskih slučajeva, koje je teže dijagnosticirati. NoV se smatra glavnim uzročnikom hranom ili vodom izazvanih gastroenteritisa (Rizzo i sur., 2007). Velika je opasnost i zbog toga što se neki školjkaši primjerice kamenice jedu sirove ili slabo termički obrađene, a NoV može biti prisutan u velikoj koncentraciji zbog bioakumulacije. Unatoč odsutnosti tretmana za viralne gastroenteritise, identifikacija uzročnika osobito u slučaju izbijanja

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

rekombinaciji sojeva NoV. Zbog same strategije procjene rizika potrebno je provesti pretraživanje školjkaša na prisutstvo NoV. U Evropi, European Committee on Normalisation (CEN), je osnovao radnu grupu stručnjaka (CEN/TC 275/WG6/TAG4), na razvoju horizontalne metode za detekciju NoV i HAV u hrani, uključujući školjkaše.

Literatura

- Anonimno (2001): Norwalk-like viruses – Public health consequences and outbreak management. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report 2001, CDC, 50, 1-18.
- Anonimno (2004): Pravilnik o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za izlov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjaka (N.N. RH 117/04).
- Anonimno (2007a): Zakon o veterinarstvu (N.N. RH 41/07).
- Anonimno (2007b): Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (N.N. RH 99/07).
- Anonimno (2009a): Pravilnik o mikrobiološkom razvrstavanju i postupku u slučaju onečišćenja živih školjaka (N.N. RH 67/09).
- Anonimno (2009b): Pravilnik o tržišnim standardima određenih proizvoda ribarstva (N.N. RH 67/09).
- Anonimno (2009c): Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjaka za 2009. godinu (N.N. RH 31/09).
- Anonimno (2010): Naredba o mjerama zaštite

- životinja od zaraznih i nametnikih bolesti i njihovom financiranju u 2010. godini (N.N. 7/10).
- Ambert-Balay, K., F. Bon, F. Le Guyader, P. Pothier, E. Kohli (2005): Characterization of New Recombinant Noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 43, (10), 5179-5186.
- Bon, F., K. Ambert-Balay, H. Giraudon, J. Kaplan, S. Le Guyader, M. Pommepey, A. Gallay, V. Vaillant, H. de Valk, R. Chikhi-Brachet, A. Flahaut, P. Pothier, E. Kohli (2005): Molecular Epidemiology of Calciviruses Detected in Sporadic and Outbreak Cases of Gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J. Clin. Microbiol.* 43, (9), 4659-4664.
- Bratoš, A., B. Glamuzina, A. Benović (2004): Hrvatsko školjarstvo-prednosti i ograničenja. *Naše more*, 51, (1-2), 59-62.
- Bull, R. A., E.T.V.Tu, C.J. McIver, W.D. Rawlinson, P.A. White (2006): Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44, (2), 327-333.
- Bull, R. A., M.M. Tanaka, P.A. White (2007): Norovirus recombination. *J. Gen. Virol.* 88, 3347-3359.
- Čadež, V., E. Teskeredžić (2005): Patogeni mikroorganizmi i toksini koje prenose školjkaši iz onečišćenih područja — zoonoze. *Ribarstvo*, 63, (4), 135-145.
- Gallimore, C.I., D. Cubitt, N. du Plessis, J.J. Gray (2004): Asymptomatic and Symptomatic Excretion of Noroviruses during a hospital outbreak of Gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 42, (5), 2271-2274.
- Koopmans, M., E. Duizer (2004): Foodborne viruses; an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90, (1), 23-41.

- Krstulović, N., M. Šolić (1997): Mikrobiološko zagađenje mora. *Hrvatska vodoprivreda*, VI, (55), 31-35.
- Kurtović, B., E. Teskeredžić (2001): Zoonoze organizama koji žive u vodi. *Ribarstvo*, 59, (4), 159-169.
- Le Guyader, F., S. Pamaudeau, J. Schaeffer, A. Bosch, F. Loisy, M. Pommepey, R.L. Atmar (2009): Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, (3), 618-624.
- Lopman, B.A., M.H. Reacher, Y. van Duinhoven, F.X. Hanon, D. Brown, M. Koopmans (2003): Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9, (1), 90-96.
- Mašić, M. (2004): Higijena i tehnologija prerade školjaka. *Meso*, VI, (4), 40-45.
- McDonnell, S., K.B. Kirkland, W.G. Hlady, C. Aristeguieta, R.S. Hopkins, S.S. Monroe, R.J. Glass (1997): Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis. *Arch. Intern. Med.* 157, (1), 111-116.
- Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, R.V. Tauxe (1999): Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625.
- Nordgren, J., A. Matussek, A. Mattsson, L. Svensson, P.E. Lindgren (2009): Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water research*, 43, 1117-1125.
- Prato, R., P.L. Lopalco, M. Chirona, G. Barbuti, C. Germanio, M. Quarto (2004): Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infectious diseases*, 4, (37), 1471-2334.

- Rizzo, C., I. di Bartolo, M. Santantonio, M. Francesca, C.R. Monno, D. de Vito, F.M. Ruggeri, G. Rizzo (2007): Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. *BMC Infectious diseases*, 7, (135), 1471-2334.
- Schwab, K.J., F.H. Neill, M.K. Estes, T.G. Metcalf, R.L. Atmar (1998): Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.* 61, 1674-1680.

- Shieh, C., S.S. Monroe, R.L. Fankhauser, G.W. Langlois, W. Burkhardt, R.S. Baric (2000): Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J. Infect. Dis.* 181, (2), 360-366.
- Skaramuca, B., Z. Teskeredžić, E. Teskeredžić (1997): Mariculture in Croatia, history and perspectives. *Ribarstvo*, 55, (1), 19-26.
- URL: http://ec.europa.eu/fisheries/dialog/acfa130308_annex2_en.pdf
- URL: <http://www.opcina-starigrad.hr/HTML/>

- Uzgoj%20daganja.html
- Valić, J. (2005): Norwalk-like virusi – uzročnici na koje treba misliti. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 1, (3).
- WHO (2004): Marine Biotoxins. *FAO Food and Nutrition Paper 80. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome*
- Zaprimljeno 17.3.2010.
- Prihvaćeno 17.5.2010.

Norovirus in Krustazeen als akutes Problem der heutigen Zeit

Zusammenfassung

Die Zucht von Meeressorganismen hat die Adriatische Küste entlang eine lange Tradition, die aus dem 19. Jh. datiert. Die Nahrungswerte der Muscheln gründen auf dem Verhältnis von Eiweiß und Fett, neben großen Mengen von Glykogen. Die Organismen, die im Wasser leben, stellen für den Menschen einen großen Nutzen dar, jedoch sind sie auch eine reale Gefahr für die Gesundheit. Die Krustazeen filtern große Wassermengen, um sich zu ernähren und auf diese Weise kumulieren sie verschiedene Pathogene mit dem Ursprung aus menschlichem Feces. Mit der Annahme der Europäischen Regulative (European regulation 91/492/EC), die die annehmbare Menge der Bakterienpathogene vorschreibt, hat sich der Einfluss der Bakterien auf Ausbruch von Gastroenteritis bedeutend verringert, jedoch nicht auf die Krankheiten verursacht durch virulente Erreger. Das Norovirus (NoV, früher „Norwalk-like-virus“) stellt den wichtigsten Erreger der nichtbakteriellen Gastroenteritis in der Welt dar. In der industrialisierten Welt ist das Norovirus der mögliche Erreger für mehr als 80 % aller Ausbrüche von Gastroenteritis. Das NoV gehört zu der Familie Calciviridae, es ist in fünf Genogruppen geteilt (GI-G5), für Genogruppen GI, GII und GIV ist es bekannt, dass sie Krankheiten bei Menschen erregen. Nach der Infektion verursacht durch die Krustazeen verbreitet sich die Infektion bei Menschen durch den fekal-oralen Weg, obwohl die Übertragung der Krankheit von Mensch zu Mensch auch durch den direkten Kontakt erfolgen kann, oder durch die virulente Partikel im Aerosol. Obwohl die Krankheit hauptsächlich mild und selbstlimitierbar ist, kann sie auch bei Patienten, die sonst schon gesundheitliche Probleme haben, ernst sein. Es gibt vier Grundprobleme bei der Detektion des NoV aus Krustazeen; das niedrige Niveau der Viruskontamination, die große Virusvariabilität, die Anwesenheit von interferierenden Substanzen, die die molekulare Detektion inhibieren und die genetische Variabilität des NoV. Es gibt zwei Schritte bei der Detektion von Enterovirus aus kontaminierten Krustazeen, u.zw. die Absonderung und die Konzentration von Virus aus dem Hepatopankreas der Krustazeen und die Detektion von Virus mit Hilfe von reversiblen Transkription (RT) der PCR Methode. Wegen der Strategie der Risikoeinschätzung ist es nötig, die Krustazeen auf die Anwesenheit von NoV zu prüfen. In Europa (CEN) wurde eine Arbeitsgruppe von Fachleuten gegründet, die für Entwicklung und Validität der referenten horizontalen Methode für die Detektion des NoV in Nahrung, einschließlich Krustazeen, zuständig ist.

Schlüsselwörter: Krustazeen, Norovirus, Gastroenteritis

I norovirus dai molluschi come un problema acuto odierno

Sommario

L'allevamento di organismi marini lungo la costa adriatica ha una tradizione che risale nell'800. Il valore alimentare di molluschi dipende dalla reciprocità tra i grassi e le proteine, comprese anche grandi quantità di glicogeno. Gli organismi appartenenti all'ambiente acquoso offrono grandi opportunità ad organismo umano, ma al contempo rappresentano grande pericolo per l'uomo. I molluschi filtrano grandi quantità d'acqua per nutrirsi, ma in questa maniera accumulano diversi patogeni provenienti dai feces umano. Essendo stato accolto il Regolamento europeo (European regulation 91/492/EC) che proscrive le quantità tollerabili di patogeni batterici, è notevolmente diminuita l'influenza dei batteri sull'apparato di gastroenterite, ma non aveva nessun influsso sulle malattie d'origine virale. Il norovirus (NoV, prima chiamati "Norwalk-like virus") rappresenta la più importante causa dell'enterite non batterica in generale. Nel mondo industrializzato il NoV è possibilmente responsabile per più dell'80% di tutte le gastroenteriti che appaiono. Il NoV fa parte delle Calciviridae, ed è diviso in cinque genogruppi (GI-GV), e dei genogruppi GI, GII e GIV è ben noto che causano le malattie dalla gente. Dopo di essersi contagiata dai norovirus esistenti nei molluschi contaminati, la gente contagiata diffonde il virus in modo fecale-orale, anche se la malattia può essere diffusa nel contatto diretto da una persona all'altra, oppure via le particelle nell'aerosol. Siccome la malattia è, nella maggior parte dei casi, lieve e autolimitabile, può mostrarsi grave dai pazienti che già soffrono da qualche altra malattia. Ci sono quattro problemi principali presenti nella detezione dei NoV dai molluschi: il livello alto di contaminazione virale, grande variabilità del virus, presenza delle sostanze interferenti che inibiscono la detezione molecolare e la variabilità genetica del NoV. La detezione di enterovirus dai molluschi contaminati sottintende due passi: isolamento e concentrazione dei virus da hepatopancreas di molluschi e la detezione del virus con l'aiuto della trascrizione reversa (RT) di metodo PCR. Per la strategia stessa di valutazione rischio bisogna sottoporre i molluschi all'analisi di presenza dei NoV. Il CEN ha fondato in Europa un gruppo di esperti per lo sviluppo e la validazione di un referente metodo orizzontale per la detezione dei NoV negli alimenti, molluschi inclusi.

Parole chiave: molluschi, norovirus, gastroenterite

Noroviruses in bivalve shellfish as the acute problem of these days

Summary

Cultivation of marine organisms has a long tradition that dates from the 19th century along the Adriatic coast. Nutritional value of shellfish is based on the proteins and fat, with large amounts of glycogen. Except for the great value of sea organisms, they are also a real danger to human health. Mussels filter large amounts of water to feed, and in that way they bioaccumulate a variety of pathogens, of human faeces origin. By the adoption of the European regulation (European regulation 91/492/EC), which prescribes an acceptable amount of bacterial pathogens, the impact of bacteria on the outbreak of gastroenteritis is significantly reduced, as opposed to the outbreaks caused by viral pathogens. Norovirus (NoV, "Norwalk-like virus") is the most important cause of non-bacterial gastroenteritis in the world. In the industrialized world NoV is probably responsible for more than 80% of all gastroenteritis outbreaks. NoV belongs to the family Calciviridae and is divided into five genogroups (GI-GV); genogroups GI, GII and GIV are known to cause disease in humans. After infection of people with contaminated shellfish, the epidemic is spreading by fecal-oral route, although the disease can get transmitted by the direct contact from person to person, or by viral particles in aerosol. Gastroenteritis is mostly mild and self-limiting, but it can be serious in patients with some other health problems. There are four basic problems in detection of NoV from shellfish: low levels of viral contamination, high variability of the virus, the presence of substances that inhibit molecular detection and genetic variability of NoV. There are two steps in detection of enteroviruses from contaminated shellfish; the first is extraction and concentration of viruses from the shellfish hepatopancreas and the detection of viruses by reverse transcription (RT) PCR. Due to the risk assessment strategy, analyzing of shellfish for the presence of NoV should be implemented. In Europe (CEN), there was established a working group of experts for the development and validation of reference method for the horizontal detection of NoV in food, including shellfish.

Key words: bivalve shellfish, norovirus, gastroenteritis