

Epidemiologija *Cryptosporidium* spp. u školjkaša pod antropogenim utjecajem

Žuvić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:754098>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

Luka Žuvić

**EPIDEMIOLOGIJA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U
ŠKOLJKAŠA POD ANTROPOGENIM UTJECAJEM**

Diplomski rad

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

**EPIDEMIOLOGIJA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U
ŠKOLJKAŠA POD ANTROPOGENIM UTJECAJEM**

Diplomski rad

Predmet: Parazitologija morskih organizama

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Ivona Mladineo

Student:

Luka Žuvić

Komentor:

Dr. sc. Slaven Jozić

Split, rujan 2018.

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivoni Mladineo koja mi je pomogla pri izradi ovoga rada, svojim brojnim savjetima i odgovorima na pitanja.

Zahvaljujem se komentoru dr.sc. Slavenu Joziću na pomoći i savjetima pri izradi ovoga rada.

Posebno zahvaljujem doc.dr.sc. Mireli Petrić i doc.dr.sc. Juri Brčiću što su doprinijeli konačnom izgledu ovog rada.

Hvala kolegicama Anamariji Vrbatović i Nikolini Penović te kolegi Jerku Hrabaru na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Hvala kolegici Ivani Lepen Pleić i kolegici Ivi Žužul na podršci i savjetima.

Zahvaljujem se i kolegama iz Laboratorija za plankton i toksičnost školjkaša na ustupljenom prostoru i opremi.

Veliko hvala svim kolegama iz Laboratorija za akvakulturu.

Na kraju veliko hvala svim profesorima Sveučilišnog odjela za studije mora na prenesenom znanju.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Morsko ribarstvo

Diplomski rad

EPIDEMIOLOGIJA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U ŠKOLJKAŠA POD ANTROPOGENIM UTJECAJEM

Luka Žuvić

Sažetak

U ovom radu predstavljeni su rezultati istraživanja prisutnosti protozoarnog nametnika *Cryptosporidium* spp. sredozemne dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) izložene antropogenom utjecaju, kao i učinkovitost pročišćavanja bakterije *Escherichia coli* iz dagnji smještenih u pokusnom sustavu za pročišćavanje Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Analizirane jedinke prikupljene su na uzgajalištu Stipan Jaz u Marini pokraj Trogira, postavljene u pergolare, te ostavljene dva dana na morskoj lokaciji izloženoj antropogenom izvoru mikrobiološkog onečišćenja. Istraživanje prisutnosti *Cryptosporidium* spp. dalo je negativne rezultate, na što su mogli utjecati različiti čimbenici (niska koncentracija ili nedostatak oocista prisutnih u moru, razrjeđenje oocista zbog slatkovodnog dotoka, kemijski i fizički čimbenici). Istraživanje koncentracije bakterije *E. coli* te učinkovitosti pročišćavanja dalo je očekivane rezultate. Koncentracija *E. coli* kod nepročišćenih dagnji netom stavljenih u sustav za pročišćavanje je bila visoka, što ukazuje na značajno mikrobiološko onečišćenje područja u kojem su dagnje bile postavljene, te učinkovitost dagnji u koncentriranju *E. coli*. Rezultati pročišćavanja pokazali su nagli pad koncentracije *E. coli* u prvih 12 sati pročišćavanja, nakon čega je slijedila blaga stagnacija tj. sporiji pad koncentracije *E. coli* nakon 24 i 48 sati pročišćavanja. Također je primijećeno da je koncentracija *E. coli* nakon 48 sati pročišćavanja smanjena na iznos manji od najmanje dozvoljene koncentracije za uzgojno područje A (≤ 230 *E. coli*/100 g tkiva i međuljuštune tekućine). Temeljem toga se može zaključiti da u specifičnim okolnostima *Cryptosporidium* spp. ne predstavlja rizik za infekciju čovjeka, a provedeni proces pročišćavanja omogućava uspješno uklanjanje *E. coli* iz dagnje.

(67 stranica, 21 slika, 12 tablica, 126 literaturna navoda, 1 prilog, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Cryptosporidium*, *Mytilus galloprovincialis*, *E. coli*, PCR, Jadran

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivona Mladineo

Komentor: Dr. sc. Slaven Jozić

Ocjenjivači: 1. Doc. dr. sc. Jure Brčić
2. Izv. prof. dr. sc. Ivona Mladineo
3. Doc. dr. sc. Mirela Petrić

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Marine Fishery

MSc Thesis

EPIDEMIOLOGY OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. IN BIVALVES UNDER ANTHROPOGENIC INFLUENCE

Luka Žuvić

Abstract

This paper presents the results of assessment of the protozoan *Cryptosporidium* spp. presence in the Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to anthropogenic influence, as well as the efficiency of purification of the bacterium *Escherichia coli* from mussels placed in the experimental purification system of the Institute of oceanography and Fisheries, Split. Analysed samples collected from the farming site Stipan Jaz in Marina close to Trogir were placed in plastic nets (*pergolas*) and left for two days at the marine location exposed to the anthropogenic source of microbiological contamination. *Cryptosporidium* spp. presence in the mussels showed negative results, which could have resulted from a variety of factors (low concentration or total absence of oocysts in the water column, reduction of oocysts due to freshwater flow, chemical and physical factors). In contrast, the concentration of *E. coli* bacteria and the efficiency of the treatment gave the expected results; the former was high in untreated mussels placed in the purification treatment system, indicating towards a significant microbiological contamination of the location under anthropogenic influence, and the capability of mussels to accumulate *E. coli*. Purification results showed strong decrease in *E. coli* levels in the first 12 hours of purification, after which a slow stagnation i.e. slower decrease in *E. coli* levels followed, after 24 and 48 hours of purification. Also, it has been noted that the concentration of *E. coli* after 48 hours has been reduced to the levels lower than the lowest permitted concentration for the farming site A (≤ 230 *E. coli*/100 g tissue and liquor). Based on this, it can be concluded that in specific conditions *Cryptosporidium* spp. does not represent a risk for human infection, while the applied purification process enables successful clearance of *E. coli* from the mussels.

(67 pages, 21 figures, 12 tables, 126 references, 1 appendix, original in: Croatian)

Keywords: *Cryptosporidium*, *Mytilus galloprovincialis*, *E. coli*, PCR, Adriatic

Supervisor: Ivona Mladineo, PhD / Associate Professor

Co-supervisor: Slaven Jozić, PhD

Reviewers:

1. Jure Brčić, PhD / Assistant Professor
2. Ivona Mladineo, PhD / Associate Professor
3. Mirela Petrić, PhD / Assistant Professor

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Općenito o rodu <i>Cryptosporidium</i>	1
1.1.1. Sistematika roda <i>Cryptosporidium</i>	3
1.1.2. Razvojni ciklus <i>Cryptosporidium</i> spp	6
1.1.3. Kriptosporidioza	8
1.2. Bakterije	10
1.2.1. Koliformne bakterije	11
1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	12
1.3. Školjkaši	15
1.3.1. Sredozemna dagnja <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	16
1.3.2. Bolesti koje se prenose putem školjkaša	18
1.3.3. Stavljanje školjkaša na tržište	19
1.4. Dosadašnja istraživanja	20
1.4.1. Pristup otkrivanja <i>Cryptosporidium</i> oocista u školjkašima	20
1.4.2. Pojavnost <i>Cryptosporidium</i> oocista u školjkašima	22
1.4.3. Pročišćavanje školjkaša i prevencija bolesti	23
1.5. Svrha i ciljevi rada	23
2. MATERIJALI I METODE	25
2.1. Uzorkovanje	25
2.2. Obrada tkiva školjkaša za pretragu na <i>Cryptosporidium parvum</i>	25
2.3. Molekularna analiza	27
2.3.1. Izolacija DNA iz homogenata digestivne žlijezde	27
2.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izoliranih DNA uzoraka	29
2.3.3. Ugniježđena lančana reakcija polimerazom izoliranih DNA uzoraka	37
2.3.4. Gel elektroforeza DNA uzoraka	41
2.4. Određivanje najvjerojatnijeg broja <i>E. coli</i> u uzorcima dagnji	43
3. REZULTATI I RASPRAVA	46
3.1. Parazitološka pretraga dagnji na prisustvo nametnika <i>Cryptosporidium</i> spp	46
3.2. Određivanje učinkovitosti pročišćavanja <i>E. coli</i> iz dagnji	51
4. ZAKLJUČCI	54
5. LITERATURA	55
6. PRILOZI	65

1. UVOD

Morska bogatstva su vrlo cijenjeni i značajan izvor hrane na području Sredozemlja, što posebno dolazi do izražaja posljednjih godina stavljanjem naglaska na zdravu i raznoliku prehranu sredozemnog tipa. Iznimno važan udio u toj prehrani čine školjkaši, koje se može konzumirati toplinsko obrađene, blago toplinski obrađene ili sirove. Školjkaše se stoga često svrstava u delicije, ali i u kategoriju zdravstveno rizične hrane. Za tržište našeg područja iznimno su značajne plosnata europska kamenica *Ostrea edulis* i sredozemna dagnja *Mytilus galloprovincialis* zbog svojih senzorskih svojstava, mineralnih tvari, visokokvalitetnih bjelancevina, vitamina te esencijalnih aminokiselina (Mašić, 2004).

Obzirom da su školjkaši filtrirajući organizmi, veliku pozornost treba obratiti na strogu higijensku praksu prilikom rukovanja i sakupljanja školjakaša, pravovremeno uočavanje njihovih bolesti, te redovito provođenje zakonom propisanih kontrola prije stavljanja na tržište. Prema postojećoj zakonskoj regulativi u RH, ispitivanja ispravnosti školjakaša usredotočena su na sanitarnu ispravnost (praćenje *E. coli*) i sadržaj biotoksina (NN 99/2007), dok je ispitivanje prisutnosti nametnika stavljeno u drugi plan, čime postoji mogućnost ugrožavanja zdravlja potrošača.

Primjerice, nametnici koje se može posredno naći kod školjakaša jesu protisti *Giardia* spp. i *Cryptosporidium* spp., koje parazitiraju u kralješnjaka, uključujući i ljude. U more najčešće dospijevaju putem fecesa divljih ili domaćih životinja, ispiranjem tla i otpadnim ili površinskim vodama kontaminiranim cistama.

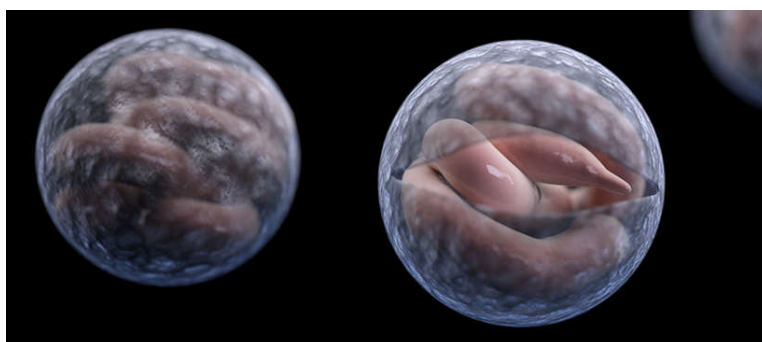
1.1. Općenito o rodu *Cryptosporidium*

Vrste roda *Cryptosporidium* se danas smatraju jednim od najvažnijih patogenih protista za mnoge vrste životinja i čovjeka. Put do otkrivanja *Cryptosporidium* spp. trajao je gotovo 90 godina, još od 1907. godine kada je Tyzzer opisao jednostanične organizme smještene unutar žljezdanog tkiva želudca miša. Godine 1955. Slavin je pronašao slične tvorbe u crijevu purana (*Meleagris gallopavo*) te je smatrao da su oni uzročnici akutnog enteritisa, iako je do tada bilo uvriježeno da su protisti iz roda *Cryptosporidium* spp. apatogeni. Slavin je novootkrivenoj vrsti dao naziv *Cryptosporidium meleagridis*, koji je kasnije prihvaćen kao uzročnik kriptosporidioze purana, popraćene proljevom i uginućima (Huzjak, 1999).

Nekoliko desetljeća nakon prvih Slavinovih istraživanja i drugi su istraživači u brojnim vrstama kralješnjaka utvrdili prisutnost kriptosporidija, a posebno značajni nalazi su bili u domaćih životinja i ljudi. Poznato je da su tada već bila utvrđena brojna oboljenja kod ljudi koja su bila uzorkovana infekcijama domaćih životinja, te su kriptosporidije već tada svrstane u zoonotska oboljenja. Posljednjih godina posebnu pozornost se daje bolesnicima oboljelim od sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS) i ljudima podvrgnutim imunosupresivnoj terapiji zbog dokazane uloge kriptosporidija u pogoršanju stanja kod takvih osoba (Huzjak, 1999).

Rod *Cryptosporidium* se sastoji od protozoarnih nametnika koji parazitiraju u mikrovilnom području epitelnih stanica gastrointestinalnog trakta kralješnjaka. Nametnik uglavnom uzorkuje povremeni proljev kod imunokompetentnih osoba, iako infekcija može biti kronična i za život opasna kod osoba koje imaju narušen imunološki sustav (Hunter i sur., 2007). Vrijeme inkubacije bolesti je oko sedam dana (Anonimus, 2017), dok sama bolest u prosjeku traje od šest do devet dana (Hunter i sur., 2007), iako su zabilježeni i slučajevi u trajanju od 100 do 120 dana (Ryan i sur., 2014).

Oociste *Cryptosporidium* spp. (Slika 1) su prisutne u velikom broju organskih uzoraka, stoga se kriptosporidioza može prenijeti na različite načine, uključujući neposredan dodir sa zaraženom osobom ili životinjom, te konzumiranjem kontaminirane hrane ili vode (Xiao, 2010). Pojavom molekularnih alata za karakterizaciju i filogenetsku analizu ovog nametnika, omogućen je napredak u razumijevanju biologije, epidemiologije, te javno-zdravstvene važnost raznih vrsta *Cryptosporidium*.



Slika 1. Digitalni prikaz oociste s debelom stijenkom i izlazak sporozoita iz oociste (izvor: <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/index.html>).

1.1.1. Sistematika roda *Cryptosporidium*

Rod *Cryptosporidium* pripada koljenu Apicomplexa - truskovci, koji uključuje nametničke eukariote koji u nekoj fazi životnog ciklusa sadrže apikalni (vršni) kompleks. Ime roda je uspostavljeno je 1907. godine, kada je Tyzzer u histološkim rezovima uočio jednostanične organizme pričvršćene na epitelnim stanicama žljezdanog tkiva želuca miša. Pretpostavljao je da ti sporozoitima nemaju vidljive spore, nazvavši ih po grčkoj riječi *cryptos* što znači skriven. Lager je 1911. godine svrstao rod *Cryptosporidium* u porodicu *Cryptosporidiidae*. Glavno je obilježje roda *Cryptosporidium* da parazitiraju uz samu površinu stanice ili u četkastom porubu stanične membrane, intracelularno, ali vancitoplazmatski. Oociste roda *Cryptosporidium* imaju četiri sporozoita bez sporociste (Levine, 1985).

Truskovci *Cryptosporidium* mogu imati monokseni ili homokseni životni ciklus, što podrazumijeva složen razvoj u organizmu jednog domaćina (Levine, 1985). Vrsti koju je pronašao u žljezdanom tkivu želuca miša, Tyzzer je dao ime *Cryptosporidium muris* i opisao sve njene oblike nespornog i spolnog razvoja sporogonije. Do 1955. godine smatralo se da su kriptosporidije komenzali, kada Slavin 1955. godine publicira nalaz nove vrste, *Cryptosporidium meleagridis* (Weber i Philip, 1983), uzročnika intestinalne kriptosporidioze praćene proljevom i uginućem, iz čega je razvidna patogenost nametnika.

Kasnijim istraživanjima otkriveni su novi domaćini i vrste kriptosporidija, a svaka novootkrivena vrsta ime je dobila sukladno tadašnjim shvaćanjima da istovjetno kokcidijama, i kriptosporidije pokazuju specifičnost prema organizmima domaćina (Tyzzer, 1907; Sloper i sur., 1982; Tzipori, 1985). I to se međutim pokazalo netočnim, kada su 1980. godine Tzipori i suradnici s oocistama izoliranim iz teladi uspješno invadirali telad, svinje, štakore, zamorčice, piliće, a humanim izolatom miševima i janjad (Huzjak, 1999). Ovakav rezultat naveo je na pogrešno mišljenje da se rod *Cryptosporidium* sastoji od samo jedne vrste.

Levine 1984. godine na osnovi dotadašnjih saznanja predlaže klasifikaciju roda *Cryptosporidium* u četiri vrste: *Cryptosporidium muris* koji parazitira u sisavcima, *Cryptosporidium meleagridis* u pticama, *Cryptosporidium crotali* u gmazovima i *Cryptosporidium nasorum* u ribama.

Nova sistematika ima uporište u rezultatima studija unakrižnog prijenosa infekcije, gdje je uspješni prijenos bio moguć jedino unutar homogene klase kralježnjaka, ali ne i između heterogenih klasa (O'Donoghue, 1985; O'Donoghue i sur., 1987).

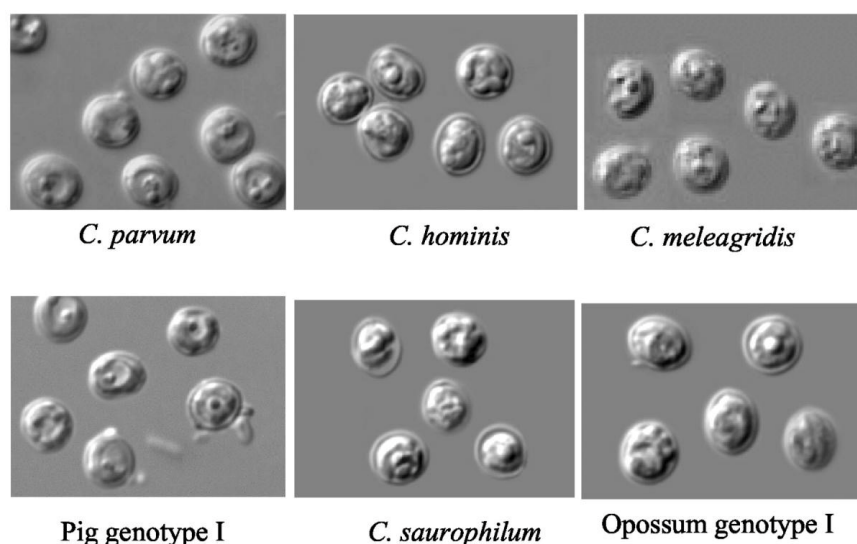
Godine 1985. Upton i Current su utvrdili prisutnost dviju međusobno različitih oocista kada su istraživali feces teladi s proljevom, a koje su se razlikovale i biologijom i morfologijom. Stoga su predložene dvije vrste roda *Cryptosporidium* koje invadiraju sisavce: *Cryptosporidium parvum* i *Cryptosporidium muris*. Također su i kod peradi predložene dvije vrste: *Cryptosporidium meleagridis* i *Cryptosporidium baileyi* (Current i sur., 1986).

Određivanje vrsta unutar koljena Apicomplexa tradicionalno se temeljilo na detekciji morfoloških značajki pomoću svjetlosnog ili elektronskog mikroskopa, na temelju životnog ciklusa i specifičnog domaćina. Budući da su oociste *Cryptosporidium* spp. jedni od najmanjih egzogenih stadija bilo kojeg truskovca i nemaju prepoznatljive morfološke osobine za jasno razlikovanje vrsta *Cryptosporidium*, morfologija se ne može koristiti (Fall i sur., 2003). Minimalni zahtjevi koje se mora ispuniti prilikom imenovanja novih vrsta roda *Cryptosporidium* su: morfometrijske studije oocista, genetska karakterizacija s informacijama o sekvencama koje su pohranjene u GenBank bazi podataka, dokazivanje prirodnih, i ukoliko je moguće barem nekih eksperimentalnih specifičnosti domaćina, te poštivanje međunarodnog zakona za zoološku nomenklaturu (Egyed i sur., 2003; Xiao i sur., 2004; Jirku i sur., 2008).

Do danas je opisano ukupno 25 vrsta unutar roda *Cryptosporidium* (Slika 2), uključujući nedavno opisani *Cryptosporidium viatorum* kod ljudi i *Cryptosporidium scrofarum* u svinja (Caccio i Widmer, 2014). Postoji također preko 40 genotipova, s velikom vjerojatnošću da će mnogi od njih dobiti status vrste s pooštrenom biološkom i molekularnom karakterizacijom (Ryan i sur., 2014). Razumijevanje dinamike prijenosa *Cryptosporidium* je vrlo teško jer je većina vrsta morfološki vrlo slična. Stoga su potrebni alati za molekularnu karakterizaciju kao što su PCR i DNA sekvencioniranje kako bi pouzdano identificirali vrste i genotipove *Cryptosporidium*. Genetski biljezi, ribosomalna RNA 18s i hipervarijabilni 60-kDa glikoprotein, uvelike se koriste za identifikaciju vrsta i praćenje prijenosa (Xiao, 2010; Plutzer i Karanis, 2009; Ng i sur., 2011).

U okviru koljena Apicomplexa uglavnom se proučavaju *Cryptosporidium* spp. koje se smatraju crijevnim kokcidijskim nametnicima, sličnim drugim crijevnim kokcidijskim nametnicima, temeljem svog životnog ciklusa i morfoloških osobitosti (Levine, 1988). Unatoč sličnostima, *Cryptosporidium* pokazuje niz osobitosti koje se razlikuju od drugih kokcidijskih. To uključuje mjesto *Cryptosporidium* unutar stanice domaćina, gdje je faza endogenog razvoja ograničena na apikalni dio stanice domaćina; vezivanje nametnika na stanicu domaćina u višemembranskom području ili blizu vakuola radi lakšeg unosa hranjivih tvari iz stanice domaćina; prisutnost dva morfo-funkcionalna tipa oocista; sposobnost pokretanja autoinfektivnog ciklusa u inficiranom domaćinu; mala veličina oocista (4,4 – 4,9 µm za *C.*

parvum); izostanak morfoloških struktura kao što su sporociste i mikropili (Tzipori i Widmer, 2000; Petry, 2004); neosjetljivost na antikokcidijske terapeutike (Cabada i White, 2010); i prisutnost novog ekstracelularnog stadija koji je sličan stadijima zabilježenim u životnom ciklusu *Gregarinida* – lat. gomilice (Hijjawi i sur., 2002; Rosales i sur., 2005).



Slika 2. Oociste različitih vrsta roda *Cryptosporidium* (izvor:

<http://www.emedmd.com/content/cryptosporidium-and-cryptosporidiosis>).

Gregarinida su raznolika skupina apikompleksnih nametnika, koji su veliki, jednostanični i nastanjuju crijeva i druge vanstanične prostore beskrležnjaka i nižih kralježnjaka uglavnom vodenih staništa (Barta i Thompson, 2006; Levine, 1988). Molekularna filogeneza upućuje na to da je *Cryptosporidium* evolucijski različit od drugih kokcidija, ali je u bliskom srodstvu s Gregarinida (Barta i Thompson, 2006; Zhu i sur., 2000). Genomski i biokemijski podatci također ukazuju da se *Cryptosporidium* razlikuje od ostalih apikompleksa, jer su izgubili apikoplastnu organelu (Zhu i sur., 2000; Abrahamsen i sur., 2004).

Osim navedenog, rod *Cryptosporidium* je izgubio mnoge *de novo* biosinteze, kao što je sposobnost sinteze aminokiselina i nukleotida (Ryan i sur., 2014). Nedavno provedena istraživanja tijekom kojih se sekvencirao čitavi genom Gregarinida, pokazuje filogenetsku srodnost vrste *Ascogregarina taiwanensis* (Slika 3) s *Cryptosporidium*. Sekvencioniranjem genoma *C. muris*, utvrdila se prisutnost mitohondrijske strukture i proteina koji su odsutni kod *C. parvum* i *C. hominis*, ali su prisutni kod Gregarinida (Widmer i Sullivan, 2012). Stoga bi buduća genomska istraživanja trebala pružiti jasnije razumijevanje točnog taksonomskog položaja roda *Cryptosporidium*.



Slika 3. Larve nametnika *Ascogregarina taiwanensis* (izvor: <http://jeb.biologists.org/content/216/2/230>).

1.1.2. Razvojni ciklus *Cryptosporidium* spp.

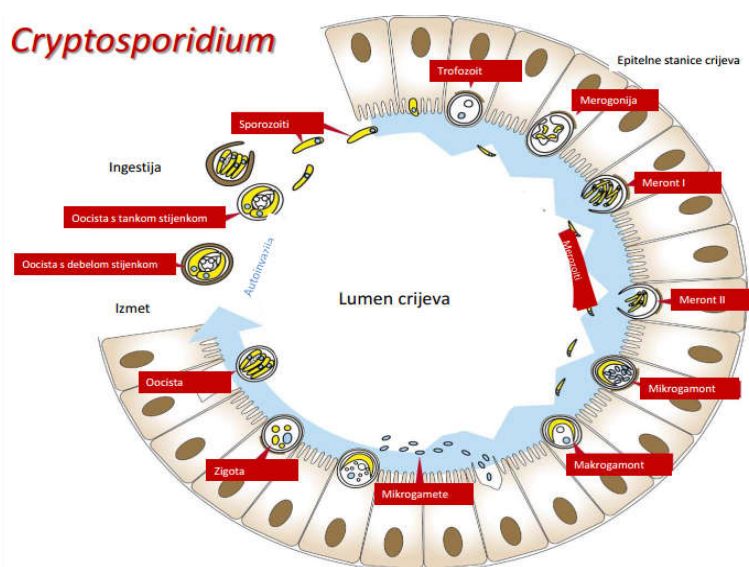
Poznavanje životnog ciklusa nametnika je vrlo značajno. Životni ciklus *Cryptosporidium* spp. (Slika 4) počinje peroralnim unošenjem oociste u organizam, iako je moguća i aerogena infekcija (Huzjak, 1999). Ukoliko se oociste nalaze u organizmu odgovarajućeg domaćina, one ekscistiraju i oslobađaju četiri sporozoita, srpastog oblika i bez biča, koji kroz mikrovile parazitirane stanice ulaze pokretima savijanja i uvrtnja. Nakon ulaska u stanicu sporozoiti se preobražavaju u trofozoite koji imaju jednu jezgru i okruglasti oblik. Nespolno razmnožavanje, merogonija ili shizogonija, rezultira podjelom jezgre, pri čemu dolazi do razvoja dva tipa meronata ili shizonata. Meront tip I sadrži šest do osam jezgri koje se ubacuju u šest do osam merozoita. Svaki od merozoita ima 28 tubula i apikalni kompleks. Merozoiti mogu inficirati nove stanice unutar kojih se preobražavaju u tip I ili tip II (Huzjak, 1999).

Meront tipa II sadrži četiri merozoita u trenutku kada je potpuno formiran. Merozoiti iz meronta tipa II invadiraju nove stanice u kojima započinje spolno razmnožavanje ili gametogonija, i to procesom razdvajanja i sazrijevanja muške (mikrogametociti) i ženske (makrogametociti) stanice. Zreli makrogametociti sadrže makrogamete s krupnim lipoidnim

zrcima, dok mikrogametociti sadrže 14 do 16 mikrogameta koji nalikuju na spermije (Huzjak, 1999).

Mikrogamete oploduju makrogametu, čime nastaje zigota koja se formiranjem ovojnice pretvara u oocistu. U ovom stadiju spolnog ciklusa mogu se stvoriti oociste s tankom i osjetljivom ovojnicom ili one s debelom ovojnicom (Janoff i Reller, 1987). Oociste s tankom (jednoslojnom) ovojnicom sporuliraju *in situ*, te se iz njih u organizmu nosiocu oslobađaju sporozoiti i nastaje autoinfekcija. Oociste s debelom (dvoslojnom) ovojnicom također sporuliraju, ali za razliku od prijašnjeg slučaja one se izbacuju u vanjsku sredinu. Od svih nastalih oocista, u prosjeku 80% cista bude s debelom, a 20% s tankom ovojnicom.

Perzistirajuća kriptosporidioza u ljudi sa sindromom stečene imunodeficijencije (AIDS), posve se sigurno može dovesti u vezu s ekscistiranjem oocista tanke ovojnice koje reinficiraju domaćina kroz endogeni ciklus i dovode do autoinfekcije (Current i Long, 1983; Current i Reese, 1986).



Slika 4. Životni ciklus roda *Cryptosporidium* (prema Hengl i sur., 2017).

Ukoliko kriptosporidije promatramo svjetlosnim mikroskopom, vide se zaobljena tjelešca promjera 2 do 8 μm , smještena na površini epitela u četkastom porubu, koja strše iz lumena invadiranih organa (Bird i Smith, 1980; Cross i Moorhead, 1984; Gobel i Brandler, 1982; Nime i sur., 1976; Pohlenz i sur., 1978; Tzipori, 1988; Vetterling i sur., 1971).

Sporozoiti su obavijeni troslojnom ovojnicom i imaju oblik banane. Imaju jezgru, razgranati endoplazmatski retikulum, Golgijevo tjelešce, te specijalne organele koje predstavljaju apikalni kompleks i potvrđuju pripadnost rodu *Cryptosporidium*, odnosno

koljenu Apicomplexa. Navedene specijalne organele apikalnog kompleksa su: mikroneme, roptrije, konoidi i polarni prsten (Marcial i Madara, 1986).

Trofozoiti imaju veliku jezgru i ovalnog su oblika. U potpuno zreom trofozoitu jezgra prolazi kroz nekoliko dioba nakon kojih slijedi citokineza i stvaranje shizonata. Nezreli tofozoiti obavijeni su petoslojnom ovojnicom, od kojih su dvije vanjske ovojnice porijeklom od stanice domaćina, dok ostale tri ovojnice pripadaju samom nametniku (Marcial i Madara, 1986).

U razvojnem ciklusu *C. parvum* razlikuju se dva tipa zrelih shizonata (Currnet i Haynes, 1984; Current i Long, 1983). Jedan tip shizonata ima osam, a drugi tip ima četiri merozoita koji nalikuju banani. Unutar shizonita, merozoiti su obavijeni s troslojnom ovojnicom, koja je sastavljena od dva unutarnja i jednog vanjskog sloja (Iseki, 1979; Marcial i Madara, 1986).

Makrogamete predstavljaju ženske spolne stanice koje su obavijene vakuolom, te koje su obično položene površinski u mikrovilima. Tipična osobitost makrogameta je prisutnost razasutih polisaharidnih zrnaca u citoplazmi.

Mikrogametociti su rjeđe vidljivi, a oblikom nalikuju na shizonte. Posjeduju rezidualno tjelešce i 14 do 16 mikrogameta. Mikrogamete su štapićaste nepokretne stanice s malom količinom citoplazme u kojoj se nalazi jezgra. Oplodnja se odvija pružanjem membrane makrogametocita prema mikrogametama, najvjerojatnije prodiranjem mikrogamete u makrogamet u (Tzipori, 1988). Sama oplodnja je rijetko vidljiva jer se odvija velikom brzinom.

1.1.3. Kriptosporidioza

Kriptosporidioza je bolest koju uzrokuju sporulirane ciste kriptosporidija. Prvi simptomi oboljenja su vodenasti proljevi, uz druge znakove poremećene probave. Bolest kod imunokompetentnih ljudi uglavnom prolazi spontano, međutim kod ljudi oboljelih od AIDS-a može biti trajna i opasna. Bolest se dijagnosticira otkrivanjem antigena ili uzročnika u stolici. Ukoliko je potrebno može se liječiti nitazoksanidom.

Kriptosporidije se razmnožavaju unutar epitelnih stanica tankog crijeva. Zarazne oociste ljušte se u lumen i izbacuju fecesom. Nakon što dospiju u probavni sustav sljedećeg domaćina, ispuštaju sporozoite koji se u epitelnim stanicama preobražuju u trofozoite.

Trofozoiti se množe i stvaraju oociste, koje se otpuštaju u lumen crijeva, čime se završava ciklus. Za autoinfekciju potrebne su samo oociste s tankom ovojnicom (Anonimus, 2014).

Cryptosporidium parvum i *C. hominis* su najčešći uzročnici kriptosporidioze kod ljudi. Do infekcije najčešće dolazi fecesom zagađenom vodom, hranom, preko životinja, neposrednim dodiranjem zaražene osobe, a utvrđena je i mogućnost infekcije aerogenim putem. Neposredna kontaminacija hrane i vode fecesom zaraženih ljudi i životinja može lako dovesti do pojave kriptosporidioze, obzirom da razina klorida koja se koristi za dezinfekciju vode za piće ne uništava oociste (D'Antonio i sur., 1985).

Bolest je rasprostranjena diljem svijeta, a najveću opasnost predstavlja za djecu, imunokompromitirane bolesnike i zdravstveno osoblje koje se brine za bolesnike oboljele od kriptosporidioze (Anonimus, 2014). Bolest je vrlo česta kod ljudi s imunodeficijntnim bolestima poput AIDS-a i hipogamaglobulinemije, a utvrđena je i kod ljudi podvrgnutih imunosupresivnoj terapiji.

U ljudi, kriptosporidioza je prvi put utvrđena u imunokompetentnog trogodišnjeg djeteta s pojavom akutnog enteritisa, praćenog bolovima u trbuhu, povraćanjem i vodenastim proljevom (Lindsay i sur., 1987). U razdoblju od 1976. do 1978. godine kriptosporidioza se smatrala popratnom infekcijom imunodeficijntnih osoba (Lasser i sur., 1979; Moon i sur., 1988). Oboljeli su pokazivali povišenu temperaturu i kronični proljev koji je trajao od 10 dana pa čak do 3 godine (Casemore i sur., 1985). Od svih oboljelih uzeti su biopsijom uzorci jejunuma, te je u dva slučaja utvrđena *Cryptosporidium* infekcija (Meisel i sur., 1976), dok se kod trećeg slučaja radilo o miješanoj infekciji s bičušem *Giardia lamblia* (Lasser i sur., 1979). Kod prva dva slučaja oboljeli nisu imali dodir sa životinjama, dok je kod trećeg slučaja oboljela osoba bila farmer, no kod njega je došlo do brzog oporavka nakon prestanka davanja imunosupresivne terapije (Huzjak, 1999). Daljnjim istraživanjem pokazalo se da je kriptosporidija oboljelih ljudi morfološki istovjetna s kriptosporidijom pronađenom u životinja (Bird i Smith, 1980).

U razdoblju od 1980. do 1983. godine objavljeno je više od osamdeset radova na temu *Cryptosporidium* infekcije i gastroenteritisa imunokompetentnih i imunodeficijntnih osoba, osobito sa sindromom stečene imunodeficijncije (AIDS) (Pitlik i sur., 1983). Upravo je pojava AIDS-a dovela do ozbiljnijeg izučavanja humane kriptosporidioze.

Rezultati parazitoloških istraživanja u Australiji i Velikoj Britaniji pokazuju da su invazije češće kod djece (Tzipori, 1983; Casemore i sur., 1985), te da je jednaka raširenost *Cryptosporidium* infekcije kod ljudi u razvijenim i manje razvijenim krajevima (Baxby i sur., 1984; Bogaerts i sur., 1987; Hart i sur., 1984; Cross i Moorhead, 1984; Molbak i sur., 1994).

Klinička manifestacija kriptosporidioze u ljudi uvelike ovisi o stanju organizma domaćina. Kriptosporidioza se u imunokompetentnih osoba manifestira pojavom simptoma koji nalikuju gripi, uz grčeve, temperaturu, slabost i vodenasti proljev. Proljev se obično javlja već prvog dana, i razlog je gubitka težine i do 10%. Inkubacija traje od 5 do 14 dana (Anderson, 1985; Baxby i sur., 1984), koliko traju i simptomi (Nime i sur., 1976; Anderson i sur., 1982; Reese i sur., 1982; Cross i Moorhead, 1984).

U imunodeficientnih osoba kratkotrajne gastrointestinalne smetnje ubrzo prerastaju u teške, za život opasne proljeve. Većina oboljelih je imala AIDS (Current i Long, 1983; Forgacs i sur., 1983; Kocoshis i sur., 1984) i hipogamaglobulinemiju (Current i Long, 1983; Koch i sur., 1983). Pojava bolesti kod imunodeficientnih osoba lakše se povezuje s međusobnim dodirima s drugom zaraženom osobom, nego s dodirima sa životinjama (Weber i Philip, 1983).

Kriptosporidioza je često „udružena“ s različitim drugim patogenim uzročnicima, bilo da je njihova pojava simptomatska ili asimptomatska (Mathan i sur., 1985; Gross i sur., 1986). Najčešće se javlja zajedno s crijevnim bičošem *G. lambia* (Jokipii i sur., 1983; Wolfson i sur., 1984). Jedino je prisustvo kokcidije *Cryptosporidium* spp. značajno povezano s proljevom (Montessori i Bischoff, 1985; Heijbel i sur., 1987).

Kemoterapija ljudi i životinja u svrhu liječenja kriptosporidioze još nije usavršena, unatoč testiranju na velikom broju oboljelih ljudi i životinja. Za liječenje ljudi se koriste pripravci s parazitostatskim učincima kao arpronocid, nitazoksanidom i spiramicin. Terapija spiramicinom ima djelomičan učinak, čak i u liječenju bolesnika oboljelih od AIDS-a, dok je terapija nitazoksanidom kod bolesnika oboljelih od AIDS-a uglavnom neuspješna. Kako mehanizam djelovanja spiramicina na kriptosporidije nije u potpunosti poznat, još uvijek se ne zna da li do poboljšanja kliničke slike dolazi zbog neposrednog djelovanja lijeka na protozou ili zbog pozitivnog djelovanja na crijevnu floru ili kopatogene mikroorganizme. Kod životinja prilikom liječenja kriptosporidioze primjenjuje se samo simptomatska terapija, jer do sada nije pronađena učinkovita terapija ili profilaksa (Huzjak, 1999).

1.2. Bakterije

Bakterije su jednostanični prokariotski organizmi građeni od prstenaste DNA molekule koja je obavijena tj. zaštićena staničnom membranom i staničnom stijenkom. Osnovne podjele bakterija su prema morfologiji i građi stanične stijenke što se određuje

bojanjem po Gramu (Rogers, 2011). Patogene bakterije najčešće pripadaju rodovima *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Yersinia* i *Staphylococcus*, a većinu navedenih rodova je moguće pronaći i izolirati iz školjkaša. Primarni izvor alohtonih bakterija za školjkaše je fekalno onečišćenje i otpadne vode (Krstulović i Šolić, 1997). Izvorna staništa bakterija su tlo i voda (Razić, 2017), ali neke su se uspjele prilagoditi na suživot s drugim organizmima. Neke vrste su čak izgubile mogućnost rasta i razmnožavanja ukoliko nisu u suživotu s drugim organizmom. Bakterije koje žive u morskom okolišu su uglavnom Gram – negativne (Krstulović i Šolić, 1997).

Najveći broj alohtonih bakterija u more dolazi nepročišćenim ili djelomično pročišćenim gradskim otpadnim vodama. Osim toga, mikrobiološko onečišćenje može biti uzrokovano donosom velike količine zemlje s kopna uslijed velikih kiša i vjetrova, a izvor također mogu biti i kupaći (Krstulović i Šolić, 1997).

1.2.1. Koliformne bakterije

Pod koliformnim bakterijama podrazumijevaju se rodovi *Escherichia*, *Edwardsiella* i *Citrobacter* koji pripadaju plemenu *Escherichieae*, kao i svi rodovi plemena *Klebsielleae* (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* i *Serratia*), a svi pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*. U ljudskim fekalijama 95% koliformnih bakterija čine rodovi *Escherichia* i *Klebsiella* (Krstulović i Šolić, 2006). Sve koliformne bakterije su Gram – negativni štapići od kojih su neki nepokretni dok se drugi pokreću pomoću flagela. Koliformne bakterije su fermentacijski vrlo aktivne, a prilikom tog procesa proizvode velike količine plina i kiseline. Fermentiraju široki spektar ugljikohidrata, a upravo po tome koju vrstu ugljikohidrata fermentiraju i po nekim drugim biokemijskim osobinama, koliformi se međusobno razlikuju. Jedina zajednička osobina svih koliformnih bakterija je fermentiranje laktoze.

Za razlikovanje pojedinih rodova unutar skupine koliformnih bakterija najčešće se koristi niz fizioloških reakcija koji se označava kraticom IMViC (Krstulović i Šolić, 2006). Većina koliformnih bakterija sastavni su dio crijevne mikroflore crijeva zdravog čovjeka i toplokrvnih životinja, i od velike su važnosti za zdravlje obzirom da djeluju antagonistički na različite proteolitičke i patogene bakterije (Krstulović i Šolić, 2006). Osim navedenog, mnoge koliformne bakterije opskrbljuju organizam vitaminima B kompleksa. Ipak, među koliformnim bakterijama ima vrsta koje su potencijalno patogene ili su patogene, a koje izazivaju različite bolesti crijeva i drugih dijelova životinjskog i ljudskog organizma.

Koliformne bakterije su vrlo značajne jer se neke od njih koriste kao pokazatelj fekalnog onečišćenja nekih namirnica, vode za piće te vode koja služi za kupanje.

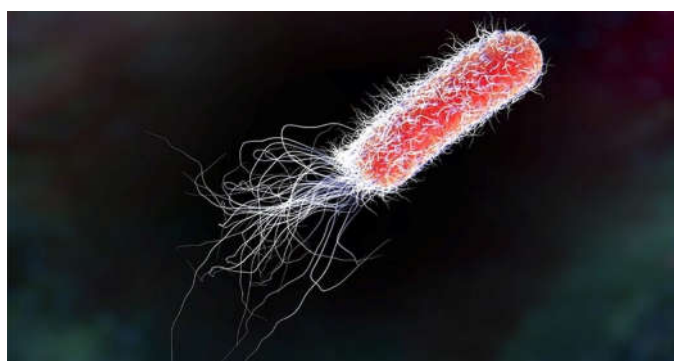
Ukupni koliformi predstavljaju skupinu aerobnih i fakultativno anaerobnih Gram – negativnih, nesporogenih štapića koji fermentiraju laktozu pri temperaturi od 35 °C i pri tome u razdoblju od 24 sata proizvode kiselinu i plin (Krstulović i Šolić, 2006). Ovoj skupini pripadaju rodovi *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Escherichia*. Ljudskim fekalijama koliformne bakterije se oslobađaju u okoliš i to u koncentracijama od 10⁷ stanica/g pa se mogu koristiti kao pokazatelji fekalnog onečišćenja. Međutim, ova skupina uključuje i koliformne bakterije nefekalnog porijekla što znači da ukupni koliformi, u određenim uvjetima, ne moraju biti specifični pokazatelji onečišćenja fekalnog porijekla (Krstulović i Šolić, 2006). U nekim slučajevima u uzorcima mora koncentracija ukupnih koliforma može biti visoka zbog donosa velike količine zemlje s kopna uslijed velikih kiša. Budući da ukupni koliformi ovisno o temperaturi, salinitetu, sunčevom zračenju i drugim čimbenicima u moru preživljavaju vrlo kratko, ova skupina ukazuje isključivo na svježije onečišćenje fekalnim materijalom ili zemljom nakon kiša.

Fekalni koliformi su podskupina unutar ukupnih koliforma. Fermentiraju laktozu pri temperaturi od 44,5 °C i pri tome u razdoblju od 24 sata proizvode kiselinu i plin (Krstulović i Šolić, 2006). Fekalni koliformi su bolji pokazatelji sanitarne kakvoće mora u odnosu na ukupne koliforme jer pokazuju visoku korelaciju sa stupnjem fekalnog onečišćenja koje potječe od toplokrvnih organizama. Najzastupljenija vrsta unutar ove skupine je *Escherichia coli*, koja čini između 75 i 95% od ukupnog broja fekalnih koliforma (Krstulović i Šolić, 2006). Fekalni koliformi u moru preživljavaju vrlo kratko kao i ukupni koliformi, te su iz istih razloga pokazatelji svježeg onečišćenja mora fekalnim materijalom.

1.2.2. *Escherichia coli*

Porodici Enterobacteriaceae pripada rod *Escherichia*, a jedina vrsta unutar tog roda je *Escherichia coli*. Theodor Escherich, njemački pedijatar i bakteriolog je 1885. godine otkrio ovu bakteriju. Kao i svi drugi koliformi, *E. coli* (Slika 5) je Gram – negativna, aerobna i fakultativno anaerobna, štapićasta bakterija (Kuna, 2013). Ne stvara spore, a neki sojevi posjeduju kapsulu, te je većina sojeva pokretljiva. *E. coli* posjeduje veliku fermentativnu i oksidativnu sposobnost. U anaerobnim uvjetima *E. coli* proizvodi laktat, sukcinat, etanol, acetat i CO₂, ne proizvodi H₂S. Serološki se razlikuju tipovi na osnovu O, K i H antigena

(Djurđević, 2014). *Escherichia coli* dobro raste na svim hranjivim podlogama, razmnožava se u temperaturnom rasponu od 10 do 46 °C, dok je optimalna temperatura 37 °C. Neki sojevi mogu rasti i pri 4 °C, a većina ih preživljava temperature znatno niže od 0 °C (Djurđević, 2014). Također je dokazano i da neki mutageni sojevi mogu vrlo kratko preživjeti pri temperaturi od 49 °C, ali nemaju sposobnost rasta i razmnožavanja. Ukoliko namirnice termički obradimo pri temperaturi 60 °C u trajanju od 15 min, možemo biti sigurni da će *E. coli* biti uništene. Najmanja a_w (a_w – engl. *minimum water activity* - minimalni protok vode) vrijednost za njihovo razmnožavanje je 0,93, a najniža pH vrijednost je 4,3 (Djurđević, 2014). *Escherichia coli* je osjetljiva na klor i klorne spojeve, dok prema različitim antibioticima i kemoterapeuticima vrlo brzo postaje otporna (Fotadar i sur., 2005). Prirodno stanište ove bakterije je crijevni sustav ljudi i toplokrvnih životinja. Neophodna je za proces probave i sintezu nekih spojeva koji su ključni za normalno funkcioniranje organizma.



Slika 5. *Escherichia coli* (izvor: <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/>).

Escherichia coli je vrlo otporna bakterija koja se lako prilagođava različitim uvjetima. Čest je kontaminant različitih namirnica, a najčešće se prenosi s čovjeka na hranu i s hrane na čovjeka. Oboljenja koja izaziva *E. coli* su uvijek u vezi s lošim higijenskim uvjetima života i lošoj pripremi hrane (Djurđević, 2014). Iako *E. coli* pripada normalnoj crijevnoj flori, veliki broj bakterijskih infekcija kod čovjeka upravo je izazvano ovom bakterijom, što je posebno izraženo kod ljudi s oslabljenim imunitetom. Unutar vrste *E. coli* postoje sojevi koji se međusobno razlikuju s obzorom na patogenost pa tako razlikujemo:

- Enterotoksikogeni sojevi *E. coli* (ETEC) uzrokuju dijareju kod čovjeka, pasa, svinja, ovaca, koza i konja. Patogenost ovih sojeva se zasniva na enetortoksinima koje sintetiziraju, a koji mogu biti termolabilni (LT) ili termostabilni (ST). LT je osjetljiv na povišenu temperaturu te se pri temperaturi od 60 °C uništava za 30 min, dok je ST izuzetno stabilan toksin čija se struktura ne narušava čak ni pri temperaturi od 100 °C u trajanju od 30 min (Matič, 2009).

Svake godine oko 200 milijuna ljudi oboli od proljeva uzrokovanog enterotoksikogenim sojevima *E. coli*.

- Enteropatogeni sojevi *E. coli* (EPEC) uzrokuju proljev kod čovjeka, konja, zečeva, pasa i mačaka. Ovi sojevi vrlo često izazivaju proljev kod novorođenčadi u zemljama u razvoju. Mogu se vezati za epitelne stanice crijeva i na tom mjestu izlučivati toksične spojeve.
- Enteroinvazivni sojevi *E. coli* (EIEC) su prisutni samo kod ljudi. Ovi sojevi izazivaju pojavu proljeva uz visoku tjelesnu temperaturu, a simptomi su identični kao kod bolesti izazvane bakterijom *Shigella* (Matič, 2009). Sojevi ne sintetiziraju toksine, već dovode do mehaničke destrukcije stanica digestivnog trakta kod čovjeka, tako što prodiru kroz sluznicu crijeva što uzrokuje krvarenje.
- Enterohemoragični sojevi *E. coli* (EHEC) su pronađeni kod čovjeka, koza i teladi. Ovi sojevi uzorkuju krvave proljeve, bez povišene tjelesne temperature. Također uzorkuju hemoragični kolitis i hemolitički uremički sindrom.
- Enteroagregativni sojevi *E. coli* (EaggEC) su prisutni samo kod ljudi. Dovode do pojave vodenog proljeva kod ljudi, a često i kod novorođenčadi (Matič, 2009). Sintetiziraju hemolizine i termostabilni enterotoksin sličan toksinu koji sintetizira ETEC (Matič, 2009). Ovi sojevi nisu invazivni. Infekcije koje izaziva *E. coli* najčešće se liječe antibiotskom terapijom, a najčešće se koristi cefalosporin, ciprofloksacin i amoksicilin. Problem prilikom liječenja ovih infekcija je što *E. coli* vrlo brzo postaje otporna prema velikom broju antibiotika, što može dovesti do dugotrajnog i teškog liječenja.

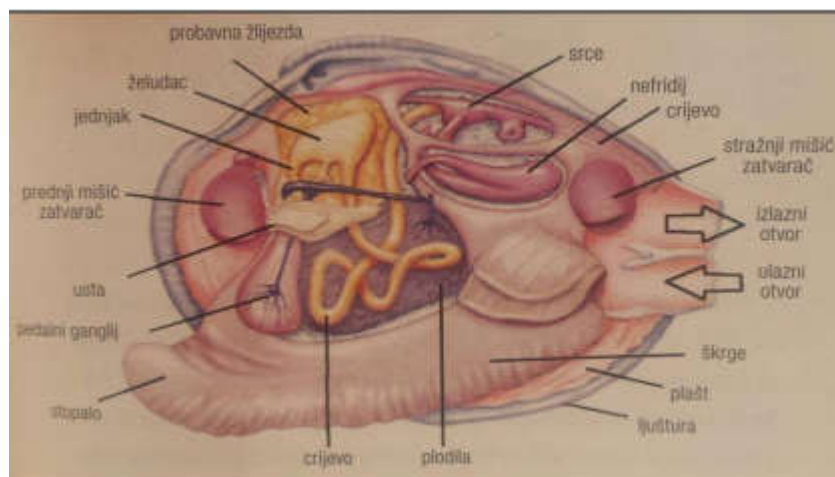
Sirovine bivaju kontaminirane s *E. coli* najčešće preko fekalija, otpadnih voda, vode za navodnjavanje, neprikladnim postupcima sa sirovinama, poluproizvodima i gotovim proizvodima u prehrambenoj industriji. Infekcija *E. coli* najčešće se događa preko fekalno-oralnog kruga kontaminacije (Matič, 2009). Prema propisima *Food and Drug Administration* - FDA (engl.) krug prijenosa se može zaustaviti pravilnom termičkom obradom namirnice te poboljšanjem i povećanjem higijenskih mjera u pogonima u prehrambenoj industriji (provjerom zdravstvenog stanja i održavanjem higijene radnika, održavanjem higijene prostorija u pogonu i uređaja, osiguravanjem odgovarajuće opreme za rad). Namirnice u kojima je moguće prisustvo *E. coli* obavezno je termički obraditi, najčešće pasterizacijom (FDA, 2006). Kontrola *E. coli* u životinjskim namirnicama je obavezna u Hrvatskoj i propisana je odgovarajućim pravilnicima.

1.3. Školjkaši

Školjkaši (razred Bivalvia) su vodene, pretežito morske životinje, koje pripadaju koljenu mekušaca (Mollusca). Prilagođeni su sesilnom ili polusesilnom načinu života (Bouchet i sur., 2010). Spljoštenog su tijela obavijenog mekim plaštom koji izlučuje lijevu i desnu vapnenastu ljušturu tj. školjku. Dvodijelnu ljušturu povezuje elastični ligament. Na presjeku ljušture razlikuju se tri sloja: vanjski tanki sloj izgrađen od organske tvari konhiolina, ispod njega nalazi se deblji prizmatični sloj izgrađen od kalcijevog karbonata, i unutarnji sedefasti sloj.

Na stražnjem kraju tijela nalazi se ulazni i izlazni otvor (Slika 6). Kod školjkaša koji se zakopavaju u morsko dno stražnji dio plašta je produljen u sifon, kraću ili dulju stezljivu cijev pomoću koje je životinja u dodiru s vodom iznad dna. Na prednjem dijelu tijela nalazi se usni otvor koji se nastavlja na jednjak i želudac. Dišni organi tj. škrge sastoje se od dva reda škržnih lamela smještenih ispod plašta. Od osjetilnih organa školjkaši imaju statociste koji im služe za ravnotežu, i jednostavno građene oči koje su smještene duž plaštenog ruba. S donje strane tijela nalazi se sjekirasto ili prstasto mišićno stopalo koje može varirati u veličini, a služi za ukopavanje u pijesak ili mulj, a u manjoj mjeri za puzanje. U stopalu školjkaša nalazi se bisusna žlijezda koja izlučuje bisusne niti koje se u vodi brzo stvrdnu, i služe za pričvršćivanje na čvrstu podlogu. Školjkaši prikupljaju hranu filtracijom vode na način da voda ulazi u plaštanu šupljinu, struji preko škrge i time dobavlja hranjive čestice, a odvodi ugljikov dioksid (Veršec, 2016). Zadržane hranjive tvari probavljaju se izvanstanično i unutarstanično, a postoji i mehanizam izbacivanja pseudofecesa (Habdija i sur., 2011).

Školjkaši imaju otvoreni optjecajni sustav i uglavnom su razdvojenog spola, dok je oplodnja najčešće vanjska, a razvoj posredan kroz preobrazbu. Za morske vrste školjkaša karakteristična je veliger ličinka, koja je slična ličinki trohofori. Ovisno o vrsti, mogu živjeti ukopani u sediment, pričvršćeni na različite podloge ili slobodno na morskom dnu (Matoničkin i sur., 1998).



Slika 6. Unutrašnja građa školjkaša (prema Bačić i sur., 2009).

1.3.1. Sredozemna dagnja *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

Sredozemna dagnja, *Mytilus galloprovincialis* je školjkaš sredozemnog područja, a uz nju u Europi postoje još dvije vrste dagnji, *Mytilus edulis* i *Mytilus trossulus*. *Mytilus galloprovincialis* je rasprostranjena u Sredozemnom moru, Crnom moru i uz južni dio zapadne obale Europe, a prisutna je i na svjetskoj razini zahvaljujući marikulturi te njenom lakom širenju i kompetitivnom ponašanju u odnosu na druge školjkaše. *Mytilus edulis* je rasprostranjena uz atlantsku obalu Europe od Francuske do Norveške, dok je *M. trossulus* rasprostranjena u Baltičkom moru i u područjima Škotske (Kijewski i sur., 2010).

Glavne osobitosti po kojima je sredozemna dagnja prepoznatljiva su ljuštura trokutastog oblika i čvrste građe te prepoznatljivih boja koje variraju od crne s plavim ili ljubičastim nijansama do tamnosmeđe, a rijetko i svijetlosmeđe (CABI, 2011). Ljuštura školjkaša je u prosjeku duga 5 cm (DAFF, 2012). Na vanjskom dijelu ljušture jasno se mogu vidjeti linije rasta (Slika 7A). Anatomija dagnje je prikazana na Slici 7B.

Dagnje su pretežito gonohoristi s manjim udjelom hermafrodita. Kod oba spola, spolna žlijezda je smještena u plaštu, a spol se može odrediti makroskopski na osnovi boje gonada; muške gonade su mliječno bijele ili krem boje, dok su ženske gonade narančasto crvenkaste boje (Linardić, 2014; Lazić, 2016).

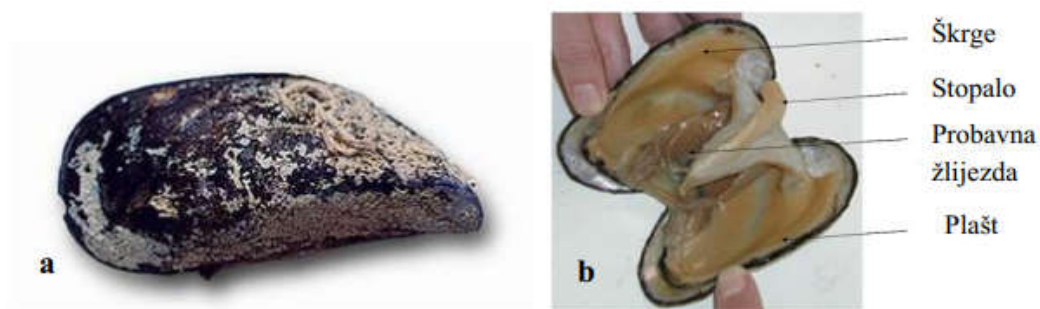
Dagnje se mogu mrijestiti jednom ili više puta godišnje, ovisno o uvjetima okoliša kao što su temperatura i količina hrane. Prilikom mriješćenja dagnja ovisno o veličini i plodnosti može izbaciti od 1 pa čak do 25 milijuna jajašaca. Dva dana nakon oplodnje embrij se razvija u veliger ličinku. Ličinački razvoj u planktonu traje od 10 do 20 dana, tijekom kojeg se

ličinke slobodno nose strujama. Ličinke se nakon 4 do 8 tjedana, nakon što dosegnu dužinu od 250 do 300 μm , pričvrste za podlogu (Bayne, 1965; Linardić, 2014).

Sredozemna dagnja se uglavnom nalazi na umjereno zaklonjenim i izloženim stjenovitim obalama u zoni plime i oseke, dok ne nastanjuje jako muljevita i pjeskovita područja. Dubinska rasprostranjenost nije uvjetovana uvjetima u dubljim slojevima, već biološkim čimbenicima kompeticije i predacije (Linardić, 2014). *Mytilus galloprovincialis* širi se prema sjeveru i zauzima staništa na kojima se prije nalazila samo vrsta *M. edulis* što se pripisuje globalnom zatopljenju (Linardić, 2014), te se stoga smatra invazivnom vrstom (Kijewski i sur., 2010).

Dagnje se hrane filtriranjem vode kroz velike sitaste škrge. Pritom čestice zaostaju na škržnim lamelama, odakle se cilijama prenose prema ustima, prilikom čega se neprestano sortiraju po veličini (DAFF, 2012). Zbog svojih do sada spomenutih osobitosti, dagnje se vrlo često koriste za praćenje utjecaja onečišćenja na organizme u vodenom okolišu. Obzirom na to da su filtratori, akumuliraju velike količine toksina iz vodenog okoliša (Cajaraville i sur., 2000), a često su vrlo brojne na onečišćenim područjima zbog svoje visoke tolerancije na zagađenje. Kako su dagnje u svom odraslom stadiju sesilni ili polusesilni organizmi, ne mogu izbjeći utjecaj onečišćenja ukoliko se nalaze na onečišćenom području pa su zbog toga dobri modelni organizmi. U Jadranu je dagnja vjerojatno najčešće korišten organizam za biomonitoring morskog ekosustava. Korištena je u brojnim istraživanjima, uključujući „Projekt Jadran“ tj. istraživanje utjecaja onečišćenja na morski ekosustav na hrvatskoj strani Jadrana.

Dagnje su u prehrani ljudi vrlo značajne zbog svoje hranjive vrijednosti. Meso školjkaša predstavlja važan izvor sastojaka potrebnih čovjekovom organizmu kao što su bjelančevine. Osim toga njihovo meso je lakše probavljivo i pogoduje boljem iskorištavanju aminokiselina. Mineralne tvari također su obilno zastupljene u optimalnim omjerima. Meso dagnji je bogato i vitaminima A, D, E te vitaminima B kompleksa, a najviše je zastupljen vitamin C (Mašić, 2004).



Slika 7. Vanjska ljuštura (A) (FAO, 2016) i anatomija sredozemne dagnje (B) (prema Craft i sur., 2010).

1.3.2. Bolesti koje se prenose putem školjkaša

Školjkaši su izrazito izloženi različitim kontaminacijama prvenstveno zbog njihovog načina prehrane, odnosno filtriranja vode koja često sadrži viruse, bakterije i nametnike, ali i različite toksine kao što su teški metali, pesticidi, biotoksini i druge štetne tvari. Ova pojava naziva se bioakumulacija. Rizik od kontaminacije putem školjkaša, koja može imati i smrtne posljedice, svojstven je svim potrošačima, ali rizik se znatno povećava kod ljudi s već utvrđenim zdravstvenim problemima ili kod ljudi koji konzumiraju sirove školjkaše. Školjkaši koji se nalaze u izrazito zagađenom okolišu u većini slučajeva su kontaminirani pesticidima, teškim metalima i ostacima lijekova. Ozbiljnu prijetnju zdravlju predstavljaju biotoksini kao što su saksitoksin koji uzrokuje paralitička trovanja, domoična kiselina koja može uzrokovati paralitička ili neurotoksična trovanja (Veršec, 2016), te okadaična kiselina koja uzrokuje proljev. Virusni uzročnici bolesti kod školjkaša su enterovirusi, adenovirusi, norovirusi i hepatitis A virus. Vrste bakterija koje su uzročnici bolesti koje se prenose školjkašima pripadaju rodovima *Salmonella*, *Shigella* i neke vrste roda *Vibrio*, a uz njih česti uzročnici su vrste *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* i *Escherichia coli*. Veliku pozornost izazivaju i protozoe koje često sekundarno parazitiraju školjkaše, a to su *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* i *Toxoplasma gondii* (Oliveira i sur., 2011).

Potrebno je naglasiti da školjkaši navedene štetne tvari akumuliraju u znatno većim koncentracijama od onih u kojima se te tvari nalaze u vodi. Biotoksini i kemijske toksične tvari se ne mogu neutralizirati toplinskom obradom školjkaša, dok veliki dio bakterija bude uništen kuhanjem. Međutim, veliki je problem što u većini slučajeva toplinska obrada kod školjkaša ne bude dovoljna, pa je zbog toga neophodno održavati odgovarajuću temperaturu tj. hladni lanac, kako se bakterije i drugi patogeni organizmi ne bi umnožavali nakon izlova.

1.3.3. Stavljanje školjkaša na tržište

U Hrvatskoj školjkaši predstavljaju važan udio u prehrani ljudi, a na to ukazuju mnogobrojni ostaci i otkrića školjki i ribolovnih alata još iz kamenog doba. Prvi zapisi o izlovu školjkaša u Hrvatskoj potječu iz 16. stoljeća, a prvi zapisi o uzgoju školjkaša u Malostonskom zaljevu iz 17. stoljeća. Kod nas najveće značenje u uzgoju i prometu imaju kamenica i dagnja, dok je prstace (*Lithophaga lithophaga*) zakonom zabranjeno izlovljavati i stavljati u promet (Mašić, 2004).

Ulazak Hrvatske u Europsku uniju, te prihvaćanje i usklađivanje europskih propisa je dovelo do promjene u školjkarskoj industriji. Da bi se školjkaše moglo staviti na domaće ili međunarodno tržište, važno je provoditi propisane procedure te zahtjeve vezane za potrebnu infrastrukturu (Jug-Dujaković i sur., 2011). Žive se školjkaše smije staviti na tržište u svrhu maloprodaje samo preko otpremnog centra gdje ih se mora označiti identifikacijskom oznakom (Veršec, 2016). Prema pravilniku (NN 99/2007), školjkaše koji su izlovljeni iz područja A može se neposredno stavljati na tržište za prehranu ljudi, školjkaši iz područja B prije stavljanja na tržište moraju proći proces ponovnog polaganja ili pročišćavanja (purifikacije), a školjkaši iz područja C ne smiju ići na tržište dok ne budu na duže vrijeme ponovno položeni u svrhu uklanjanja kontaminacije ili ih se mora toplinski obraditi (Tablica 1).

Tablica 1. Podjela uzgojnih područja prema najvišoj dopuštenoj količini *E. coli* (prema NN 99/2007).

Uzgojno područje	<i>E. coli</i>
A	$\leq 230/100$ g tkiva i međuljuštune tekućine
B	$< 4600/100$ g tkiva i međuljuštune tekućine
C	$< 46000/100$ g tkiva i međuljuštune tekućine

Pročišćavanje je metoda kojom se školjkaše prije stavljanja na tržište stavlja u pogone s čistom vodom i pod kontroliranim uvjetima na određeno vrijeme, a u svrhu pročišćavanja njihovog cijelog tkiva. Otpremni centri se mogu nalaziti na kopnu ili na plovilima, a igraju važnu ulogu u osiguravanju zdravstvene ispravnosti i sigurnosti školjkaša namijenjenih za

ljudsku prehranu, obzirom da do kontaminacije školjkaša može doći prilikom izlova, uzgoja ili dopremanja do otpremnog centra. Stoga i za purifikacijske i otpremne centre, kao i u drugim granama prehrambene industrije, vrijede minimalni zahtjevi kojima moraju udovoljiti da bi se školjkaši stavili na tržište (Jug-Dujaković i sur., 2011).

1.4. Dosadašnja istraživanja

1.4.1. Pristup otkrivanja *Cryptosporidium* oocista u školjkašima

Iako su rijetko dokumentirane epidemije kriptosporidiozom putem školjkaša, ova grupa se smatra kao potencijalno prijenosno sredstvo. Ne samo da se školjkaši tradicionalno konzumiraju sirovi ili slabo termički obrađeni, već su i pokusi pokazali da oociste *Cryptosporidium* mogu preživjeti blagu toplinsku obradu kod dagnji (Gomez-Couso i sur., 2006). Školjkaši vjerojatno dolaze u dodir s nametnikom u njegovim prijenosnim fazama kada putem odljeva otpadnih voda ili otjecanjem s kopna dolazi u estuarijska područja ili područja u blizini obale. Nametnik se u takvim vodama akumulira u tkivo školjkaša zbog njihovog specifičnog načina prehrane koja uključuje filtriranje velikih volumena vode i koncentraciju čestica (Robertson i Gjerde, 2007).

Iako još ne postoji opisana ili neka standardna prihvaćena metoda za analizu školjkaša kontaminiranih *Cryptosporidium* oocistama (Robertson i Gjerde, 2007), neki istraživači pokušavaju razviti metodu u kojoj se prati učinkovitost oporavka umjetno kontaminiranih školjkaša prilikom pročišćavanja. Općenito većina metoda počinje homogenizacijom tkiva školjkaša, ili metodom ispiranja škrgi ili hemolimfe, iako homogenati tkiva daju bolje rezultate (MacRae i sur., 2005). Međutim, gubitak oocista može biti znatan prilikom homogenizacije tkiva, osobito ako se tkivo prosijava prije analize (Schets i sur., 2007). Neki smatraju da su najbolji rezultati dobiveni u kamenice kada je hemolimfa zadržana odvojeno tijekom homogenizacije cijelog tkiva kamenice, te je dodana u talog nakon ekstrakcije homogenata dietil eterom (Downey i sur., 2008). Nakon toga slijedi postupak koncentracije tj. centrifugiranje, a zatim postupak pročišćavanja i izolacije, koji može biti nespecifičan (na primjer, flotacija na cezijum kloridu ili saharozi, ili ekstrakcija lipida) ili specifičan (IMS – imunomagnetno razdvajanje). Iako se IMS smatralo korisnim od strane većine istraživača, na rezultate utječe vrsta matrice; tako je npr. proces učinkovitiji kod dagnji nego kod kamenica

(MacRae i sur., 2005), dok drugi nisu dobili zadovoljavajuće rezultate s kamenicama, pa je metoda u kamenice uglavnom odbačena (Schets i sur., 2007).

Na temelju relativno visokog proteinskog sadržaja školjkaša, koji se ovisno o vrsti može kretati od 8% do 20%, Robertson i Gjerde su 2007. godine razvili metodu digestije pepsinom koja se temelji na metodologiji koja se obično koristi za detekciju ličinki oblića *Trichinella* spp. u mesu i ličinki oblića *Ostertagia ostertagi* iz sluznice kod stoke. Ova metoda je pokazala relativno veliku uspješnost (70-80%), nakon koje slijedi IMS izolacija oocista i IFAT (engl. *immunofluorescent antibody test*) detekcija (Robertson i Gjerde, 2007). IFAT je modificirao Willis i sur. 2013. godine, time što je digestiju pepsinom zamijenio proteinskom digestijom, nakon čega slijedi koncentriranje tj. centrifugiranje i ispiranje u deterdžentu, čime je izbjegnut skupi IMS postupak. Ova izmijenjena metoda ima prednosti jer je znatno jeftinija, a razlike u rezultatima su vrlo male. Međutim, ova metoda nije u potpunosti modificirana za analizu uzoraka s većom količinom tkiva, a taj problem se u nekim slučajevima može riješiti uključivanjem dodatnih koraka pročišćavanja (Robertson, 2014). Daljnja istraživanja s proteinskom digestijom bi u budućnosti mogla pružiti standardiziranu metodu koja se može smatrati pogodnom ukoliko je potvrde i drugi laboratoriji.

Iako se u većini studija IFAT koristi kao metoda detekcije *Cryptosporidium* kontaminacije u svježim proizvodima, nekoliko istraživačkih skupina koje analiziraju prisutnost *Cryptosporidium* oociste kod školjkaša koriste druge tehnike ili kombiniraju IFAT s drugim tehnikama kao što su fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) i lančana reakcija polimerazom (PCR) (Robertson, 2014). Smatra se da je PCR manje osjetljiva metoda nego IFAT, pa bi bilo idealno kada bi se različite tehnike međusobno nadopunjavale. Iako molekularne metode mogu omogućiti istovremenu identifikaciju vrsta, ovo se može raditi i IFAT tehnikom. Učinkovitost primijenjene metode međutim, uvelike ovisi o vrsti školjkaša. Jedna od studija koja je uspoređivala učinkovitost metoda za otkrivanje *Cryptosporidium* oocista kod školjkaša, utvrdila je da je najosjetljivija metoda za detekciju *C. parvum* oocista kombinacija IMS koncentracije s IFAT detekcijom (Miller i sur., 2006). Istražene su i molekularne metode, premda je IFAT detekcija pokazala veliku osjetljivost. Tako npr. lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction* - PCR) omogućava automatizirano ispitivanje, visoki protok i semikvantitativne podatke te je prema tome bolja od konvencionalnog PCR-a (Robertson, 2014).

1.4.2. Pojavnost *Cryptosporidium* oocista u školjkašima

Pokusna istraživanja jasno su pokazala da školjkaši imaju sposobnost zadržavanja, nakupljanja ali i filtriranja *Cryptosporidium* oocista iz okolnih voda (Graczyk i sur., 2003). Nadalje, *Cryptosporidium* oociste pokazale su veliku povezanost s morskim makroagregatima (velike čestice u moru) (Shapiro i sur., 2013). Pokusi su pokazali da su oociste dva do tri reda veličine više koncentrirane u spomenutim agregatima, nego u estuarijskim i morskim vodama oko agregata. Smatra se da makroagregati povećavaju njihovu biološku raspoloživost beskralježnjacima, a time i njihovo ugrađivanje u morsku hranidbenu mrežu (Shapiro i sur., 2013).

Iako nikad nije zabilježena kriptosporidioza ljudi povezana sa školjkašima, obavljeno je nekoliko istraživanja *Cryptosporidium* oocista kod školjkaša. Neka od ovih istraživanja provedena su s namjerom ispitivanja akumulacije oocista u školjkaša kao metoda procjene kontaminacije vode (Izumi i sur., 2012), ili čak s namjerom da se školjkaši koriste kao sredstvo za osiromašenje oocista iz kanalizacije kako bi se spriječilo daljnje onečišćenje vodenog okoliša (Izumi i sur., 2012). Međutim, većina provedenih ispitivanja uzima u obzir školjkaše kao hranu koja je potencijalno sredstvo prijenosa, te je veći broj ispitivanja proveden na školjkašima nego na voću ili drugim svježim proizvodima, usprkos tome što su voće i drugi proizvodi povezani s dokazanim epidemijama.

Štoviše, nekoliko ispitivanja kod školjkaša pokušalo je utvrditi infektivnu sposobnost oocista pronađenih u školjkašima. Infektivnost se ispitivala inficiranjem miševa, a pokazalo se da su oociste nađene u školjkaša bile zarazne. Osim miševa, infektivnost oocista se određivala i pomoću biološkog testa (analitička metoda kojom se određuje potentnost supstance temeljem njenog djelovanja na stanice i tkiva), što nije rezultiralo infekcijama kakve su utvrđene kod miševa (Robertson, 2014).

Analize molekularnim metodama su provedene kod nekih ispitivanja u svrhu dobivanja informacije koja vrsta roda *Cryptosporidium* je najčešća kod školjkaša, a rezultati su pokazali da su školjkaši najčešće kontaminirani sa *C. parvum* (Fayer i sur., 2003; Gomez-Couso i sur., 2006; Miller i sur., 2006; Molini i sur., 2007). Osim *C. parvum*, nekoliko studija je dokazalo *C. hominis* (Fayer i sur., 2003; Gomez-Couso i sur., 2006; Miller i sur., 2006; Molini i sur., 2007), dok su druge utvrdile vrste *Cryptosporidium* koje su manje povezani s ljudskim infekcijama, i to *C. baileyi* (Fayer i sur., 2003), *C. meleagridis* (Fayer i sur., 2003), *C. andersoni* (Gomez-Couso i sur., 2006), i *C. felis* (Miller i sur., 2006).

1.4.3. Pročišćavanje školjkaša i prevencija bolesti

Ho i Tam su 2000. godine istraživali *in vitro* metodu prirodnog pročišćavanja školjkaša koja se koristi u nekim državama. Navedena metoda se temelji na uranjanju onečišćenih školjkaša u čistu vodu na određeno vrijeme kako bi se prirodno pročistili. U istraživanju, školjkaši su najprije tijekom 48 sati potpuno pročišćeni u sustavima za pročišćavanje koji sadržavaju UV lampu, a zatim su stavljeni u slanu vodu s visokom koncentracijom *E. coli* (Razić, 2017). Gotovo odmah nakon postavljanja školjkaša u onečišćenu vodu bakterije su se koncentrirale u školjkašima, a najviša koncentracija bakterija u tkivu školjkaša zabilježena je već nakon 3 do 5 sati izlaganja. Nakon toga školjkaši su prebačeni u čistu vodu, a koncentracija *E. coli* kod školjkaša se počela smanjivati prvo naglo, a zatim sporije, ali ni nakon dva dana školjkaši nisu bili potpuno pročišćeni. To se povezuje s njihovim prirodnim ciklusom hranjenja koje je rezultiralo ponovnim ulaskom bakterije u školjkaše. Upravo iz navedenih razloga metoda prirodnog pročišćavanja u zatvorenom sustavu nije idealna, jer i nakon nje koncentracija mikroorganizama u školjkašima ostaje povišena. Krajnji ishod ovisi o početnoj koncentraciji mikroorganizama akumuliranih u tkivu, o kvaliteti vode u koju se školjkaši stavljaju na pročišćavanje, te o učestalosti izmjene vode (Razić, 2017).

Osim metode prirodnog pročišćavanja postoje i druge metode tj. strategije za prevenciju bolesti, a jedna takva strategija bi bila veće ulaganje u sustav pročišćavanja otpadnih voda jer su one glavni izvor mikrobiološkog onečišćenja školjkaša. Također je važna i bolja edukacija ljudi o mogućnosti zaraze i važnosti termičke obrade školjkaša (Wittman i Flick, 1995). Posebno je važno educirati skupine ljudi s oslabjelim imunitetom poput bubrežnih bolesnika, za koje je izrazito opasan *Vibrio vulnificus*. Istraživanje provedeno na bubrežnim bolesnicima pokazuje kako 48% bolesnika jede sirove školjkaše jer nisu educirani o mogućim rizicima za svoje zdravlje. Mjesec dana nakon provedene edukacije 75% ispitanika izjavilo je kako u budućnosti više neće jesti sirove školjkaše (Gholami i sur. 1998).

1.5. Svrha i ciljevi rada

Cilj ovog rada je ispitati:

- prisutnost nametnika *Cryptosporidium* spp. u dagnjama iz Jadranskog mora koje su izložene antropogenim utjecajima;

- vrijeme potrebno za pročišćavanje *E. coli* i nametnika *Cryptosporidium* spp. iz dagnji postavljenih u bazene sa slobodnim protokom vode;
- povezanost između *E. coli* i nametnika *Cryptosporidium* spp., i brzine pročišćavanja školjkaša.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje

Dagnje konzumne veličine prikupljene su na uzgajalištu Stipan Jaz u Marini pokraj Trogira (43°30'47.5"N, 16°09'20.7"E). Navedeno uzgajalište svrstano je u područje mikrobiološke kakvoće mora A. Nakon pažljivog i temeljitog čišćenja od obraštaja, dagnje su spremljene u pergolar te ostavljene dva dana u more blizu antropogenog izvora mikrobiološkog onečišćenja. Potom su dostavljene u Institut za oceanografiju i ribarstvo gdje su nakon temeljitog miješanja i uzimanja početnog uzorka (30 komada) podijeljene u tri jednake grupe. Svaka grupa podijeljena je u tri podgrupe od po 30 jedinki. Podgrupe su stavljene u mrežaste vrećice. Vrećice s dagnjama su potom obješene u bazene sa stalnim protokom svježe morske vode na način da su sve tri podgrupe iste grupe dagnji smještene u isti bazen. Na taj smo način omogućili pročišćavanje dagnji u tri replike pri istim uvjetima. Poduzorci dagnji (po jedna vrećica s 30 jedinki, iz svakog od 3 bazena) uzimani su u vremenskim razmacima od 12, 24 i 48 sati nakon početka pročišćavanja.

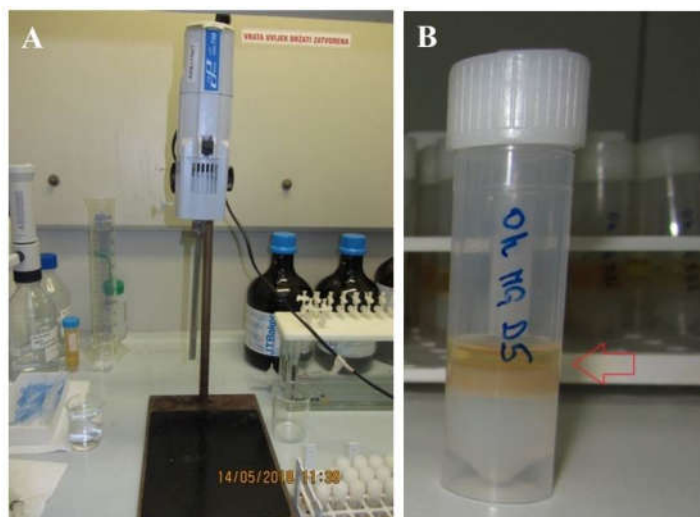
2.2. Obrada tkiva školjkaša za pretragu na *Cryptosporidium parvum*

Obrada uzoraka započeta je vađenjem i uzorkovanjem digestivnih žlijezdi 30 dagnji koje su bile izložene izravnim utjecajem antropogenog djelovanja (kanalizacije), a koje nisu postavljene u sustav pročišćavanja (oznaka 0h MGD 1-30), dok je ostalih 90 dagnji namijenjenih za parazitološku obradu uzoraka, postavljeno na pročišćavanje na način da je po 30 dagnji stavljeno u 3 različita bazena; u prvom bazenu pročišćavanje je trajalo 12 sati, u drugom 24 sata, a u trećem 48 sati (oznake 12h MGD 1-30, 24h MGD 1-30 i 48h MGD 1-30). Po završetku pročišćavanja isti postupak vađenja digestivne žlijezde primijenjen je i na pročišćenim dagnjama. Nakon što su digestivne žlijezde izvađene iz dagnji započeta je analiza tkiva školjkaša na pojavnost *Cryptosporidium parvum*. Homogenizacija tkiva školjkaša provedena je u digestoru radi korištenja dietil etera tijekom postupka. Sve digestivne žlijezde stavljene su u tubice od 5 ml te je u tubice dodan 1 ml puferirane otopine fosfatnih soli (PBS), a nakon što je PBS dodan započeta je homogenizacijom tkiva. Digestivne žlijezde homogenizirane su pomoću štapnog homogenizatora (Ultraturax) (Slika 8A), 4x po 30 sek sa stankama između homogeniziranja. Između uzoraka štap štapnog

homogenizatora bilo je potrebno očistiti etilnim alkoholom i destiliranom vodom. U tubice s homogenatom digestivne žlijezde dodan je 1 ml dietil etera te su tubice dobro vorteksirane, najmanje 30 sek. Tubice s vorteksiranim homogenatom su postavljene na centrifugiranje 10 min/ 1250 rpm. Nakon centrifugiranja, u tubicama se stvorio prsten od homogenata digestivne žlijezde (Slika 8B), pipetom je odpipetiran supernatant do prstena (talog), a prsten izvađen žličicom i pohranjen u tubicu od 2 ml. U tubice s prstenom je dodan PBS do vrha tubice, potom su tubice dobro vorteksirane kako bi se talog što bolje isprao, a nakon toga su tubice s prstenom centrifugirane 2 min/ 13000 rpm. Po završetku centrifugiranja, u tubicama se stvorio prsten i talog na dnu, žličicom je izvađen prsten iz tubica i pohranjen u nove tubice u koje je dodan 1 ml PBS-a radi ponovnog ispiranja. Tubice su zatim dobro vorteksirane i centrifugirane 5 min/ 10000 rpm. Prethodni korak bilo je potrebno ponoviti još tri puta radi ispiranja taloga, nakon čega je uslijedila izolacija DNA (lizirajući pufer).

Protokol za obradu tkiva školjkaša za pretragu na *Cryptosporidium parvum*:

1. Svaki skupni uzorak homogenizirati u 1 ml PBS-a koristeći Ultraturax (4 pulsa od 30 sek, dodatno ako treba).
2. Dodati 1 ml dietil etera i dobro vorteksirati, minimalno 30 sek.
3. Centrifugirati 10 min, 1250 rpm.
4. Pipetom odpipetirati supernatant do prstena.
5. Žličicom izvaditi prsten i pohraniti u tubicu (2 ml).
6. U tubicu nadoliti PBS do vrha.
7. Centrifugirati 2 min, 13000 rpm (prsten se odvoji na prsten i talog).
8. Žličicom izvaditi prsten i pohraniti u tubicu (2 ml).
9. U tubicu dodati 1 ml PBS-a radi ispiranja, dobro vorteksirati da se prsten ispere, centrifugirati 5 min na 10000 rpm.
10. Ponoviti prethodni korak još tri puta, i nastaviti s izolacijom DNA (lizirajući pufer).



Slika 8. Štapni homogenizator (Ultraturax) (A) i prikaz stvorenog prstena od homogenata digestivne žlijezde nakon centrifugiranja (B).

2.3. Molekularna analiza

2.3.1. Izolacija DNA iz homogenata digestivne žlijezde

Izolacija DNA započeta je tako što je prvo uklonjen PBS iz tubice, potom je plastičnim štapićem smrvljen prsten (talog) u tubici te je dodano 200 μ l lizirajućeg pufera i 2 μ l proteinaze K (20 mg/ml). Tubice su zatim vorteksirane i kratko centrifugirane, te postavljene u termomikser (Eppendorf, Biosan) na digestiju preko noći na 55 °C i 550 rpm, tj. dok se tkivo ne raspadne (Slika 9A). Sljedećeg dana je dodano još 2 μ l proteinaze K (20 mg/ml). Završetkom digestije tubice su vorteksirane i centrifugirane 10 min/ 13000 rpm, nakon čega se u tubicama stvorio talog i supernatant u kojem se nalazi DNA. Supernatant je pažljivo odpipetiran i premješten u nove čiste tubice. U tubice je zatim dodan jednak volumen izopropanolnog alkohola (200 μ l) kao i lizirajućeg pufera. Nakon dodavanja izopropanolnog alkohola tubice su vorteksirane kako bi se faze izmiješale i centrifugirane 10 min/ 13000 rpm. Kada je centrifuga završila u tubicama se opet stvorio talog i supernatant, ali ovog puta supernatant je odliven iz tubice, a ostatak je pažljivo otpipetiran da se ne dotakne talog koji čini DNA (Slika 9B). Nakon toga u tubice je dodano 800 μ l 70% etilnog alkohola, te su tubice okretane gore-dolje nekoliko puta radi ispiranja DNA. Po završetku ispiranja DNA, tubice su centrifugirane 10 min/ 12000 rpm; supernatant iz tubica je odliven i kao prethodni put ostatak je pažljivo odpipetiran da se ne dotakne talog u kojem je DNA. Kada je supernatant uklonjen,

tubice su ostavljene otvorene 15-20 min radi sušenja taloga, a zatim je dodano 100 μ l TE pufera radi otapanja taloga. Razlog dodavanja tako velikog volumena TE pufera je taj što su talozi bili iznimno veliki, pa volumen od 20, 40 ili 45 μ l koji se inače dodaje nije bio dovoljan za otapanje taloga.

Protokol za izolaciju DNA :

1. U tubicu s prstenom dodati 200 μ l lizirajućeg pufera.
2. Dodati 2 μ l proteinaze K (20 mg/ ml) (po potrebi dodati još 2 μ l, ovisno o tkivu).
3. Vorteksirati i kratko centrifugirati.
4. Digestija preko noći na 55 °C u termomikseru uz trešnju (550 rpm) dok se tkivo ne raspadne (dodati 2 μ l proteinaze K ujutro po potrebi, ovisno o tkivu).
5. Vorteksirati, centrifugirati 10 min na 13000 rpm.
6. Premjestiti supernatant (DNA je u supernatantu) u čistu tubicu (paziti da se ne pokupi talog), po potrebi ponovno centrifugirati (7-8 min na 13000 rpm) te ispipetirati preostali supernatant.
7. Dodati 1 volumen izopropanolnog alkohola (na 200 μ l lizirajućeg pufera ide 200 μ l izopropanolnog alkohola koji obara DNA na dno).
8. Vorteksirati da bi se izmiješale faze.
9. Centrifugirati 10 min na 13000 rpm.
10. Supernatant prvo izliti, a zatim ostatak pažljivo odpipetirati pazeći da se ne dotakne talog (DNA je u talogu).
11. Nadodati 800 μ l 70% etilnog alkohola, izmiješati okrećući tubicu 5-6 puta (ispiranje DNA).
12. Centrifugirati 10 min na 12000 rpm.
13. Supernatant prvo izliti, a zatim ostatak pažljivo odpipetirati pazeći da se ne dotakne talog (DNA je u talogu).
14. Ostavite da se talog suši 15-20 min (ovisno o veličini taloga), tubicu okrenuti otvorom prema dolje.
15. Talog otopiti u TE puferu (ovisno koliko ima taloga tj. DNA, toliko dodati TE pufera, najčešće 20, 40 ili 45 μ l).



Slika 9. Uzorci postavljeni na digestiju u termomikseru (Eppendorf, Biosan) (A) i dobiveni DNA talog (B).

2.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće izoliranih DNA uzoraka

Nakon što je iz uzoraka izolirana DNA, bilo je potrebno pomoću spektrofotometra (Genova Nano) (Slika 10) odrediti koncentraciju i čistoću izolirane DNA mjerenjem omjera absorbancije na valnoj duljini A 260/280 koja se očitava radi određivanja kontaminacije DNA s proteinima, a čiji se omjer čistoće 1,8 općenito prihvaća kao optimalan za DNA, te mjerenjem omjera absorbancije na valnoj A 260/230 koja se očitava radi određivanja kontaminacije DNA fenol-kloroform-izoamil-alkoholom ili drugim aromatskim spojevima, a čiji se omjer čistoće iznad 1,8 općenito prihvaća kao optimalan za DNA. Instrument je prije početka očitavanja bilo potrebno kalibrirati dodavanjem 1 μ l TE pufera na mjesto izvora zračenja. Kada je kalibracija završena, na izvor zračenja je dodan 1 μ l izolirane DNA otopljene u TE puferu, te je očitana koncentracija i čistoća (Tablica 2, Tablica 3, Tablica 4, Tablica 5), a između uzoraka je papirom obrisano mjesto (izvor zračenja) gdje je stavljena kapljica. Obzirom da su koncentracije DNA bile iznimno visoke, bilo je potrebno smanjiti koncentraciju dodavanjem TE pufera u tubicu s otopljenom DNA.



Slika 10. Spektrofotometar (Genova Nano).

Tablica 2. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 0h MGD 1-30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA (µg/ml)	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA (µg/ml)	Čistoća DNA - A 260/280	Čistoća DNA - A 260/230
1.	100 µl	1861	1100 µl	200,8	1,918	2,029
2.	100 µl	9999	1100 µl	261,4	1,986	2,231
3.	100 µl	9999	1700 µl	393	1,897	2,286
4.	100 µl	1815	700 µl	202,2	1,969	1,822
5.	100 µl	2043	1100 µl	198,4	1,976	2,191
6.	100 µl	9999	1700 µl	359,7	1,874	2,354
7.	100 µl	9999	1500 µl	205,4	1,914	2,150
8.	100 µl	2110	1100 µl	203,7	2,009	2,169
9.	100 µl	9999	1900 µl	653,2	1,887	2,366
10.	100 µl	9999	1700 µl	356,1	2,031	2,209
11.	100 µl	9999	700 µl	282,7	1,863	2,415
12.	100 µl	9999	1300 µl	207,4	1,907	2,114
13.	100 µl	1783	900 µl	173,4	1,908	1,650
14.	100 µl	9999	1300 µl	260,7	1,991	2,278

15.	100 µl	9999	1900 µl	509	1,904	2,377
16.	100 µl	9999	1900 µl	696,8	1,916	2,332
17.	100 µl	9999	1300 µl	274,2	1,886	2,068
18.	100 µl	9999	1300 µl	260,5	1,981	2,166
19.	100 µl	2351	1100 µl	241	1,995	1,831
20.	100 µl	9999	1500 µl	255,2	1,888	2,331
21.	100 µl	68,32	/	/	2,031	2,635
22.	100 µl	930,6	700 µl	167,1	1,927	1,847
23.	100 µl	119,3	/	/	1,997	2,249
24.	100 µl	1675	1100 µl	187,2	1,940	1,732
25.	100 µl	1481	1100 µl	155,4	1,917	1,477
26.	100 µl	9999	1900 µl	467,7	1,889	2,361
27.	100 µl	9999	1900 µl	627,2	1,850	2,358
28.	100 µl	2318	1300 µl	197,9	2,205	2,175
29.	100 µl	9999	1900 µl	645,7	1,881	2,288
30.	100 µl	9999	1700 µl	258,4	1,887	2,160

Tablica 3. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 12h MGD 1-30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA (µg/ml)	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA (µg/ml)	Čistoća DNA - A 260/280	Čistoća DNA - A 260/230
1.	100 µl	9999	1900 µl	399,6	1,927	2,236
2.	100 µl	1937	1300 µl	172	1,918	1,785
3.	100 µl	1623	1300 µl	173,8	1,862	1,267

4.	100 µl	9999	1700 µl	289,4	1,834	2,354
5.	100 µl	9999	1700 µl	255,3	1,896	2,034
6.	100 µl	9999	1700 µl	265,1	1,874	2,068
7.	100 µl	2413	1500 µl	205,5	1,976	2,141
8.	100 µl	9999	1900 µl	700,8	1,872	2,336
9.	100 µl	9999	1300 µl	238,9	1,912	2,049
10.	100 µl	9999	1300 µl	243,1	1,997	2,068
11.	100 µl	1464	900 µl	178,9	1,868	1,466
12.	100 µl	9999	1300 µl	221,7	1,870	2,080
13.	100 µl	9999	1300 µl	247,9	2,025	2,277
14.	100 µl	2406	1300 µl	220,7	1,884	1,139
15.	100 µl	2366	1300 µl	200,4	1,914	1,674
16.	100 µl	1334	700 µl	205	1,896	1,676
17.	100 µl	1712	900 µl	184,4	1,876	1,437
18.	100 µl	9999	1900 µl	335,9	1,865	2,368
19.	100 µl	9999	1900 µl	231,8	1,857	2,361
20.	100 µl	2205	1500 µl	193,9	1,946	1,868
21.	100 µl	9999	1900 µl	671,6	1,846	2,375
22.	100 µl	2023	900 µl	173,2	1,863	1,702
23.	100 µl	2074	1100 µl	225,2	1,962	1,952

24.	100 µl	597	300 µl	199,5	1,994	1,882
25.	100 µl	910,3	500 µl	186,7	1,883	1,542
26.	100 µl	1548	700 µl	236,7	1,871	1,932
27.	100 µl	2262	1100 µl	246,9	1,998	1,991
28.	100 µl	480,9	300 µl	170,5	1,922	1,699
29.	100 µl	2110	1100 µl	216,9	1,924	1,930
30.	100 µl	2090	1100 µl	210,7	1,935	2,002

Tablica 4. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 24h MGD 1-30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA (µg/ml)	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA (µg/ml)	Čistoća DNA - A 260/280	Čistoća DNA - A 260/230
1.	100 µl	794,9	500 µl	175,8	1,825	1,502
2.	100 µl	1532	700 µl	236,4	1,908	1,974
3.	100 µl	1632	900 µl	201,5	1,973	1,734
4.	100 µl	9999	1900 µl	427,9	1,871	2,337
5.	100 µl	1867	700 µl	254,9	1,921	1,775
6.	100 µl	9999	1900 µl	580,8	1,850	2,292
7.	100 µl	1587	1000 µl	210,5	1,939	1,938

8.	100 µl	1880	1000 µl	234,9	1,969	2,102
9.	100 µl	802,9	500 µl	178,6	1,815	1,456
10.	100 µl	1519	700 µl	241,3	1,933	1,863
11.	100 µl	2159	1100 µl	226,2	1,970	2,159
12.	100 µl	9999	1900 µl	541,9	1,869	2,344
13.	100 µl	1209	700 µl	196,2	1,810	1,442
14.	100 µl	9999	1900 µl	486,9	1,892	2,276
15.	100 µl	835,6	500 µl	181,6	1,824	1,570
16.	100 µl	1916	900 µl	225,1	1,901	1,730
17.	100 µl	1952	700 µl	250,6	1,933	1,759
18.	100 µl	9999	1700 µl	354,3	1,821	2,089
19.	100 µl	1596	700 µl	247,3	1,848	1,476
20.	100 µl	9999	1900 µl	206	1,932	2,292
21.	100 µl	9999	1700 µl	375,2	1,883	2,584
22.	100 µl	2092	1100 µl	224,3	1,993	2,443
23.	100 µl	2156	1300 µl	194,7	1,952	2,639
24.	100 µl	9999	1900 µl	590,4	1,872	2,455
25.	100 µl	2334	1700 µl	166,7	1,950	2,682
26.	100 µl	923,1	900 µl	194,7	1,955	2,084
27.	100 µl	9999	1900 µl	522	1,865	2,567

28.	100 µl	1529	1700 µl	182,5	1,980	2,433
29.	100 µl	1638	1300 µl	147,9	1,916	2,199
30.	100 µl	9999	1900 µl	623,1	1,901	2,413

Tablica 5. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 48h MGD 1-30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA (µg/ml)	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA (µg/ml)	Čistoća DNA - A 260/280	Čistoća DNA - A 260/230
1.	100 µl	832,2	1300 µl	182	1,915	2,101
2.	100 µl	9999	1700 µl	191,4	2,008	2,379
3.	100 µl	9999	1900 µl	511,9	1,873	2,502
4.	100 µl	2249	1700 µl	247,7	1,874	2,673
5.	100 µl	2353	1900 µl	404,1	1,901	2,441
6.	100 µl	9999	1900 µl	335,6	1,937	2,330
7.	100 µl	9999	1700 µl	227,3	1,927	2,607
8.	100 µl	9999	1900 µl	631,4	1,857	2,470
9.	100 µl	2315	1700 µl	167,3	1,980	2,432
10.	100 µl	1570	1700 µl	175,9	1,999	2,431
11.	100 µl	1092	1300 µl	155,3	1,890	2,199

12.	100 µl	9999	1700 µl	235,2	2,033	2,355
13.	100 µl	982,2	900 µl	198,3	2,050	2,241
14.	100 µl	772,5	900 µl	153,3	1,885	1,690
15.	100 µl	9999	1900 µl	522,5	1,877	2,438
16.	100 µl	2173	1700 µl	253,5	2,033	2,394
17.	100 µl	1400	1300 µl	211,8	1,976	2,413
18.	100 µl	1645	1700 µl	200,9	2,050	2,503
19.	100 µl	9999	1900 µl	491,7	1,835	2,248
20.	100 µl	1863	1700 µl	214,5	2,065	2,517
21.	100 µl	1023	1300 µl	169,8	1,900	2,138
22.	100 µl	1203	1700 µl	203	1,859	2,419
23.	100 µl	1159	1300 µl	174,2	1,986	2,410
24.	100 µl	851,7	900 µl	179,1	1,871	2,075
25.	100 µl	1745	1700 µl	227,2	1,930	2,542
26.	100 µl	9999	1900 µl	641,5	1,964	2,543
27.	100 µl	9999	1900 µl	359,4	1,872	2,593
28.	100 µl	1283	1300 µl	225,4	1,995	2,312
29.	100 µl	1024	900 µl	214	1,894	1,876
30.	100 µl	9999	1900 µl	443,3	1,891	2,281

2.3.3. Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom izoliranih DNA uzoraka

Ugniježdjena lančana reakcija polimerazom (engl. *Nested polymerase chain reaction* - PCR) je modificirani PCR koji je dizajniran u svrhu poboljšavanja osjetljivosti i specifičnosti. Nested PCR uključuje dva para početnica i dvije uzastopne PCR reakcije. Prvi par početnica oblikovan je tako da se vezuju na sekvence uzvodno od drugog para početnica i koriste se u prvoj PCR reakciji. Amplikoni koji su rezultat prve PCR reakcije koriste se kao predložak za drugi par početnica i za drugi korak amplifikacije. Ovom tehnikom se može znatno poboljšati osjetljivost i specifičnost amplifikacije DNA. Međutim, potencijal za prenošenje kontaminacije s reakcije na reakciju se povećava zbog dodatne manipulacije amplikona. Da bi se smanjila mogućnost kontaminacije, različiti koraci procesa bi se trebali obavljati u različitim prostorijama i PCR uređajima.

Nakon što su koncentracije namještene i očitane (prosječnog raspona od 255 do 301 µg/ml), te su očitane čistoće izoliranih uzoraka, pripremljena je PCR smjesa za prvu PCR reakciju (1° PCR 1,5 mM MgCl₂ MIX) prema protokolu „*Cryptosporidium* typing using SSU gene PCR (nested PCR)“, autora Kristin Elwin, a kojeg potpisuje Dr. Rachel M. Chalmers. Za pripremu PCR smjese korišten je Qiagenov kit za PCR koji sadrži: H₂O, 10x pufer, MgCl₂, dNTP i HotStartTaq DNA polimerazu, te Sigma početnice: Cy 18s1F i Cy 18s1R (Tablica 6). Pripremljena smjesa razdijeljena je u 31 tubicu za PCR (0,2 ml) po 24 µl (Tablica 7). U prvim 30 tubica sa smjesom je dodan 1 µl prethodno izolirane DNA, a u trideset prvu tubicu je dodana pozitivna kontrola tj. DNA referentnog izolata *Cryptosporidium parvum* (CP11) koji je suradnjom s Kristin Elwin dostavljen iz Public Health Wales Microbiology Division, UK. Svrha pozitivne kontrole je da se u slučaju negativnih rezultata zna da su svi postupci i tehnike prilikom amplifikacije ciljanog DNA dobro odrađeni.

Tablica 6. Slijed početnica (5' → 3') uporabljenih u prvoj PCR reakciji (1° PCR 1,5 mM MgCl₂ MIX).

Cy 18s1F	TTCTAGAGCTAATACATGCG
Cy 18s1R	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA

Tablica 7. Sastojci reakcijske smjese za prvu PCR reakciju (1° PCR 1,5 mM MgCl₂ MIX).

Qiagen 1,5 Mm MgCl₂	1x (25 µl)
H ₂ O	19,87 µl
10x pufer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0 µl
dNTP	0,5 µl
PF (Cy 18s1F)	0,5 µl
PR (Cy 18s1R)	0,5 µl
DNA	1 µl
HotStartTaq DNA polimeraza	0,125 µl

PCR tubice s PCR smjesom su kratko vorteksirane i centrifugirane, a zatim su stavljene u PCR uređaj tj. termocikler (Bio-Rad) (Slika 11), te je pokrenuta PCR reakcija prateći profil ciklusa koji je prikazan u Tablici 8.



Slika 11. PCR uređaj – termocikler (Bio-Rad).

Tablica 8. Uvjeti za prvu PCR reakciju (1° PCR 1,5 mM MgCl₂ MIX).

Temperatura	Vrijeme trajanja	Broj ciklusa
95 °C	15 min	1x
94 °C	30 sek	1x
60 °C	30 sek	35x
72 °C	1 min	35x
72 °C	10 min	35x
20 °C	∞	1x

Završetkom prve PCR reakcije pripremljena je PCR smjesa za drugu PCR reakciju (2° PCR 3,5 mM MgCl₂ MIX). Korišten je isti Qiagenov kit (H₂O, 10x pufer, MgCl₂, dNTP i HotStartTaq DNA polimerazu) za PCR kao u prethodnoj reakciji, razlika je što je u smjesu dodavan MgCl₂ što nije bio slučaj u prethodnoj reakciji, te je korišten drugi par Sigma početnica: Cy 18s2F i Cy18sJR2 (Tablica 9). Smjesa je ponovno razdijeljena u 31 PCR tubicu, te je u tubice sa smjesom dodan 1 µl PCR produkta iz prethodne PCR reakcije (Tablica 10).

Tablica 9. Slijed početnica (5' → 3') uporabljenih u drugoj PCR reakciji (2° PCR 3,5 mM MgCl₂ MIX).

Cy 18s2F	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
Cy18sJR2	CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA

Tablica 10. Sastojci reakcijske smjese za drugu PCR reakciju (2° PCR 3,5 mM MgCl₂ MIX).

Qiagen 3,5 Mm MgCl ₂	1x (25 µl)
H ₂ O	17,87 µl
10x pufer (15 mM MgCl ₂)	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP	0,5 µl
PF (Cy 18s1F)	0,5 µl
PR (Cy 18s1R)	0,5 µl
DNA	1 µl
HotStartTaq DNA polimeraza	0,125 µl

PCR tubice s PCR smjesom su kratko vorteksirane i centrifugirane, te su stavljene u PCR uređaj tj. termocikler (Applied Biosystems) (Slika 12), a zatim je pokrenuta druga PCR reakcija prateći profil ciklusa koji je prikazan u Tablici 11:



Slika 12. PCR uređaj – termocikler (Applied Biosystems).

Tablica 11. Uvjeti za drugu PCR reakciju (2° PCR 3,5 mM MgCl₂ MIX).

Temperatura	Vrijeme trajanja	Broj ciklusa
95 °C	15 min	1x
94 °C	30 sek	35x
62 °C	30 sek	35x
72 °C	1 min	35x
72 °C	10 min	1x
20 °C	∞	1x

2.3.4. Gel elektroforeza DNA uzoraka

Elektroforeza je metoda koja se koristi u molekularnoj biologiji kako bi se razdvojili fragmenti DNA molekula i kako bi se utvrdile veličine razdvojenih fragmenata. Elektroforeza se zasniva na procesu gdje otopljena tvar ili čestica efektivnog naboja putuje pod djelovanjem električnog polja po viskoznom puferu (Dončević, 2017). Otopljena tvar tj. čestica ovisno o svom naboju putuje od negativne ka pozitivnoj elektrodi ili obrnuto. Tijekom elektroforeze DNA putuje od negativne ka pozitivnoj elektrodi zbog njenog negativnog naboja, pri čemu manji fragmenti prolaze brže, a veći fragmenti sporije kroz pufer. Brzina elektroforetske pokretljivosti ovisi o sljedećim čimbenicima: veličini čestica, temperaturi, pH, jakosti električne struje, električnom naboju i vremenu putovanja. Ovi čimbenici utječu na uspješnost izvedenog pokusa i na konačne rezultate. Elektroforeza nukleinskih kiselina obično se provodi u agaroznom ili poliakrilamidnom gelu, ovisno o vrsti uzoraka koji će se podvrgnuti elektroforezi. Za razdvajanje malih fragmenata (do 500 bp) najčešće se koristi poliakrilamidni gel s veličinom pora 5-100 nm, a agarozni gel se koristi za uzorke veličine molekula od 100-50000 bp (Dončević, 2017).

Nakon završetka PCR reakcije, započeta je priprema 1% agaroznog gela za gel elektroforezu uz pomoć koje će se vidjeti rezultati PCR-a. Gel je pripremljen na sljedeći

način: izvagano je 0,5 g agaroze koja je dodana u tikvicu, u koju je potom uliveno 50 ml 0,5x Tris-Acetate-EDTA (TAE) pufera. Da bi se agarosa otopila tikvica je stavljena u mikrovalnu peć u trajanju od 1-2 min uz povremenu provjeru. Kada se agarosa otopila, smjesa tj. otopina u tikvici je ohlađena vodom, u ohlađenu otopinu je zatim dodano 3 μ l SYBR SAFE boje (0,006% u ukupnom volumenu gela) koja je potrebna za gel. SYBR SAFE boja je osjetljiva na svjetlo stoga se postupak izvodio u zatamnjenoj prostoriji kako boja ne bi bila izložena neposrednom izvoru svjetla. Otopina iz tikvice je zatim izlivena u kadicu koja je prethodno oblijepljena izolir trakom da se otopina ne bih razlila, na vrh kadice su stavljena dva reda češljica koji će kada se otopina zgusne tvoriti jažice (32 jažice, 16 prvi red i 16 drugi red) u gelu, u koje će se dodavati PCR produkt obojan bojom. Kadica je zatim prekrivena s kutijom da bude u mraku 15-20 min kako bi se otopina zgusnula i stvorila gel. Kada se gel stvorio s kadice je skinuta izolir traka, te je kadica s gelom uronjena u veću kadicu u kojoj se nalazi 0,5x TAE pufer, a koja je spojena na električni uređaj koji u kadici čini električno polje. Zatim je na parafilmu koji je prethodno zalijepljen za radnu površinu otpipetirana 31 kapljica boje (6x DNA Loading Dye) volumena 1 μ l. Svaka kapljica boje je odvojeno pomiješana s 4 μ l PCR produkta druge PCR reakcije i izpipetirana u jažice u gelu, s tim da su prve jažice u prvom i drugom redu ostavljene prazne, te je u njih izpipetiran DNA biljeg (Gel pilot 100bp plus loader) nakon što su napunjene ostale jažice. Kada su sve jažice bile napunjene, veća kadica je zatim spojena na električni uređaj te je uključena struja koja teče od negativnog ka pozitivnom naboju tvoreći strujno polje. Kadica je zatim opet pokrivena kutijom da bude u mraku radi osjetljivosti SYBR SAFE boje koja se nalazi u gelu (Slika 13). Električni uređaj je postavljen na jakost struje od 100 V u trajanju od 35 min. Nakon 35 min električni uređaj je završio s puštanjem električne struje kroz električno polje i time je završena elektroforeza. Gel je izvađen iz veće kadice, te je iz kadice pažljivo postavljen na UV transiluminator, tj. uređaj s UV svjetlom (Vilber Lourmat) (Slika 14) kako bi se vidjeli rezultati.

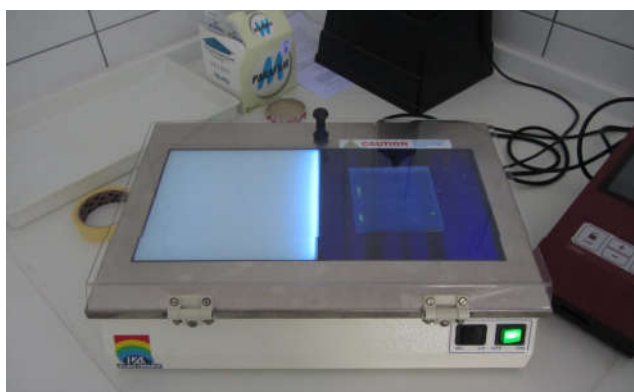
Protokol za pripremu 1% agaroznog gela:

1. Izvagati 0,5 g agaroze, istresti u tikvicu.
2. U tikvicu uliti 50 ml TAE 0,5x.
3. Otopiti u mikrovalnoj peći 1-2 min uz povremenu provjeru.
4. Ohladiti otopinu vodom.
5. Dodati SYBR SAFE boju (zamračena prostorija).
6. Izliti otopinu u kadicu za pravljenje gela, staviti češljice za pravljenje jažica i pokriti kutijom.

7. Pričekati 15-20 min dok se gel napravi.



Slika 13. Elektroforeza na agaroznom gelu uzoraka DNA umnoženih Nested PCR reakcijom.



Slika 14. UV transiluminator (Vilber Lourmat) za pregled gela.

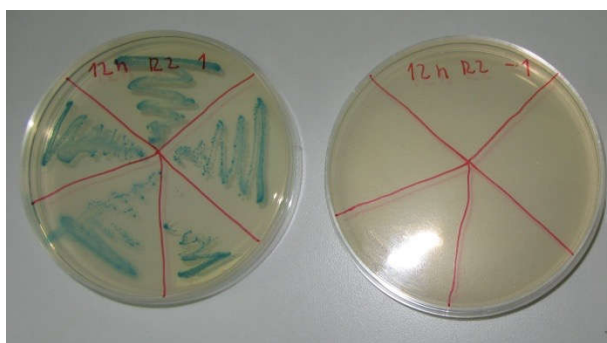
2.4. Određivanje najvjerojatnijeg broja *E. coli* u uzorcima dagnji

Koncentracija *E. coli* u dagnjama određivana je metodom najvjerojatnijeg broja (MPN) prema ISO 16649-3:2015 i Donovan i sur. (1998). Za svaki uzorak korišteno je 10 dagnji. Meso i međuljušturna tekućina dodani su u 0,1% peptonsku vodu, u masenom omjeru 1:2 te su homogenizirani u homogenizatoru (Kinematica) 4 x 15 sekundi s pauzama od 15 sekundi. Jednu minutu nakon završetka homogenizacije, 30 ml homogenata dodano je u 70 ml 0,1% peptonske vode, kako bi se pripremlilo D0 razrjeđenje homogenata (homogenat u kojem je udio mesa i međuljuštune tekućine 10%). Potom su pripremljena još 3 decimalna razrjeđenja homogenata (10 ml prethodnog razrjeđenja + 90 ml peptonske vode).

U svrhu MNP testa, decimalna razrjeđenja homogenata naciepljena su u nizove od pet epruveta s neselektivnom tekućom podlogom engl. *Mineral Modified Glutamate Broth* (MMGB) po nizu epruveta. U prvi red (niz) epruveta (dvostruka koncentracija MMGB podloge) u svaku je epruvetu naciepljeno 10 ml D0 razrjeđenja. U drugi red epruveta u svaku je epruvetu naciepljeno 1 ml D0 homogenata, u treći red po 1 ml D1 homogenata, u četvrti red po 1 ml D2 homogenata, a u peti red po 1 ml D3 homogenata. Epruvete su inkubirane 24 sata pri temperaturi 36,5 °C. Pozitivnu reakciju predstavljalo je zamućenje podloge (rast bakterija) i promjena boje podloge u žutu (promjena pH zbog fermentacije laktoze) (Slika 15). U svrhu potvrdnog testa, sve epruvete s pozitivnom reakcijom precjepljene su na engl. *Tryptone bile-x-glucuronidase agar* (TBX) podlogu te inkubirane 24 sata pri temperaturi od 44 °C. Nakon inkubacije, sve epruvete koje su na TBX podlozi rezultirale izrastom kolonija plave ili plavozelene boje smatrane su pozitivnim na *E. coli* (Slika 16). Temeljem broja pozitivnih reakcija u svakom nizu epruveta, iz MPN tablice (Prilog 1) očitana je koncentracija *E. coli* u dagnjama (MPN *E. coli*/100 ml).



Slika 15. Prikaz pozitivne (žuto obojenje) i negativne (ljubičasto obojenje) reakcije u epruvetama prilikom detekcije *E. coli*.



Slika 16. Prikaz pozitivne (plave, plavozelene kolonije) i negativne (bez kolonija) reakcije na TBX agaru prilikom potvrdnog testa detekcije *E. coli*.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Parazitološka pretraga dagnji na prisustvo nametnika *Cryptosporidium* spp.

Dosadašnja istraživanja *Cryptosporidium* spp. u školjakaša u Hrvatskoj su oskudna, a nalazi su većinom ograničeni na terestričke životinje kao što su psi i domaće životinje. Pešo i sur. (2001) su proveli istraživanje pojavnosti protozoona *Cryptosporidium* spp. u pasa na području Republike Hrvatske. Istraživanje je provedeno zbog činjenice da su psi danas jedni od najčešćih kućnih ljubimaca, te zbog velikog broja pasa litalica u slabije razvijenim dijelovima Hrvatske gdje je briga za životinje manje važan čimbenik. Istraživanje je provedeno u ruralnoj populaciji pasa, obuhvaćeno je 220 pasa s područja istočne Slavonije i Čazme. Za otkrivanje pojavnosti *Cryptosporidium* spp. korištene su modificirane i standardne metode bojenja. Pozitivan nalaz je utvrđen u 4% ispitanih pasa (n = 9 uzoraka), iz čega je zaključeno da je asimptomatska kriptosporidioza u pasa prisutna te bi stoga mogla predstavljati javno zdravstveni problem.

Također su Rajković i sur. (2008) proveli istraživanje proširenosti gastrointestinalnih nametnika u lovačkih pasa u ruralnim dijelovima istočne Hrvatske. Jajašca gastrointestinalnih plošnjaka su utvrđeni u 72% (n = 166 uzoraka) pasa, dok su ciste protozoa utvrđene u 22,08% (n = 46 uzoraka) pasa. U 20,96% (n = 48 uzoraka) pasa nisu utvrđeni razvojni stadiji nametnika. Najzastupljeniji nametnici su bili; *Trychuris* sp. čija su jajašca utvrđena u 137 (59,83%) uzoraka fecesa; nematode iz porodice ankilostomida su utvrđene u 52 (22,71%) uzorka fecesa; *Toxocara canis* je utvrđena u 42 (21,40%) uzoraka fecesa, dok su oociste protozoona *Cryptosporidium* spp. utvrđene u 38 (16,59%) uzoraka fecesa. Osim nalaza oocista *Cryptosporidium* spp. u uzorcima fecesa pasa, otkriveno je i da su oociste *Cryptosporidium* spp. značajnije zastupljene u životinja iznad 6 mjeseci starosti.

Nadalje Rajković i sur. (1997) su proveli istraživanje pojavnosti kriptosporidioze u teladi. Istraživanje u trajanju od dvije godine je provedeno na farmi mliječnih goveda u okolini Varaždina. Uzorkovano je 87 fecesa teladi, te je utvrđeno da je 43,67% invadirano s *Cryptosporidium* spp., od svakog teleta uzimani su uzorci fecesa od 1 do 27 dana života. Najranija pojava *Cryptosporidium* spp. utvrđena je u teleta starog dva dana. Utvrđeno je da gotovo 50% teladi počinje izlučivati *Cryptosporidium* spp. oociste tijekom 11 i 12 dana života, te je utvrđen i jači intenzitet invadiranosti u manjem broju uzoraka i to u teladi dobi od 8 do 12 dana života.

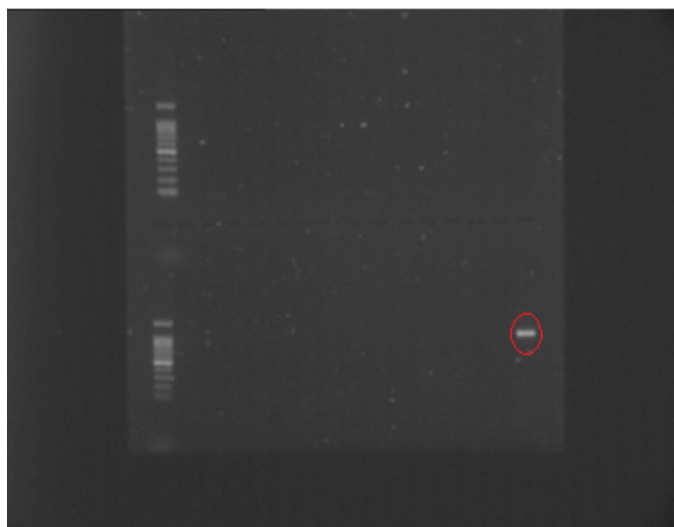
Obzirom na rezultate i mjesta gdje su provedena prethodna istraživanja mala je mogućnost da inficirani psi mogu kontaminirati more, dok bi farme domaćih životinja ukoliko su postavljene u blizini mora mogle predstavljati značajan izvor kontaminacije. Međutim, dva istraživanja objavila su nalaz *Cryptosporidium* spp. u dvije vrste školjkaša, Mladineo i sur. (2009) proveli su istraživanje na dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) iz uzgajališta u Malom Stonu. Tijekom jednogodišnjeg istraživanja analizirane su populacije dagnji sa četiri različita mjesta na području Maloga Stona. Kao metoda detekcije *Cryptosporidium* sp. korištena je metoda imunofluorescencije. Ukupna godišnja prevalencija *Cryptosporidium* spp. bila je 16,8%, te je napravljena korelacija s najvjerojatnijim brojem *E. coli* u dagnjama i morskoj vodi i abiotičkim čimbenicima (temperatura, salinitet, kisik). Rezultati ovog istraživanja upućuju na nužnost ažuriranja postojećih mjera sanitarne kontrole u Hrvatskoj.

Također su Mladineo i sur. (2011) analizirali pojavnost *Cryptosporidium* sp. i *Giardia* sp. kod brbavica (*Venus verrucosa*), koje imaju visoku trgovačku vrijednost na Sredozemlju, a u Hrvatskoj su jedna od najraširenijih vrsta školjkaša koje su zbog svoje relativno visoke tržišne cijene zanimljiv kandidat za akvakulturu. Istraživanje je provedeno na brbavicama koje su prikupljene u Kaštelanskom zaljevu. Metode korištene za detekciju *Cryptosporidium* sp. i *Giardia* sp. su imunofluorescencija i polimeraza lančana reakcija (PCR). Najveći broj *Cryptosporidium* sp. oocista je zabilježen tijekom jeseni (45/ kg školjkaša) dok je najveći broj *Giardia* sp. zabilježen zimi (556/ kg školjkaša). Bitno je spomenuti da je brojnost *Giardia* sp. oocista bila 14 puta veća od brojnosti *Cryptosporidium* sp. oocista.

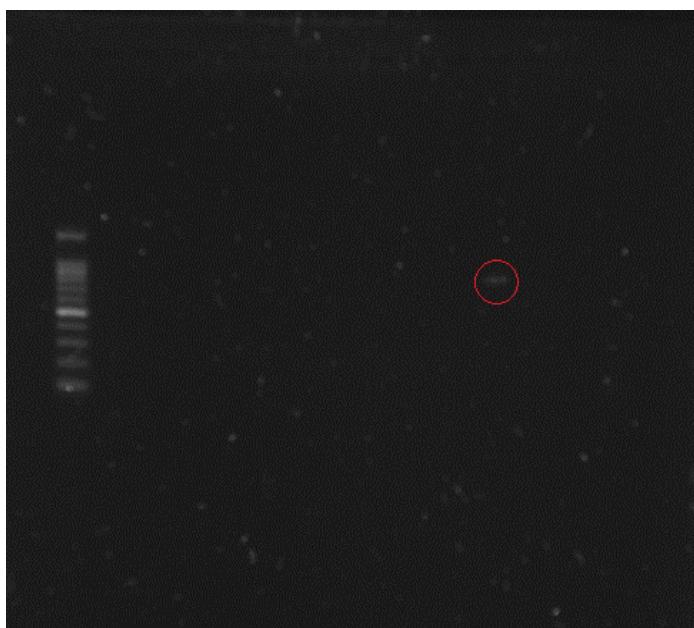
Predmetno istraživanje pojavnosti *Cryptosporidium* spp. u školjkaša pod antropogenim utjecajem, po prvi puta je upotrijebilo molekularnu metodu detekcije koristeći ugniježdenu lančanu reakciju polimerazom (Nested PCR), koja se smatra referentnom za protokol engl. „*Cryptosporidium* typing using SSU gene PCR (nested PCR)“, autora Kristin Elwin. Kako bi bili sigurni da mogući negativan nalaz amplifikacije ciljanog fragmenta DNA nematnika nije uvjetovan greškom u tehnici i postupku, upotrijebljena je i pozitivna kontrola u vidu DNA referentnog izolata *Cryptosporidium parvum* (CP11) koji je suradnjom s Kristin Elwin dostavljen iz Public Health Wales Microbiology Division.

Usprkos svemu, u ispitivanim uzorcima (ukupno 120) koji su uzorkovani tijekom 0, 12, 24 i 48 sati od postavljanja izloženih školjkaša u sustav pročišćavanja, nije otkrivena DNA *Cryptosporidium* spp. (Slika 17, Slika 18, Slika 19, Slika 20). Ovo sugerira da u dagnjama izloženim antropogenom utjecaju na specifičnoj lokaciji, nije došlo do kontaminacije oocistama nematnika. Uslijed nedostatka kontaminacije, nije bilo moguće

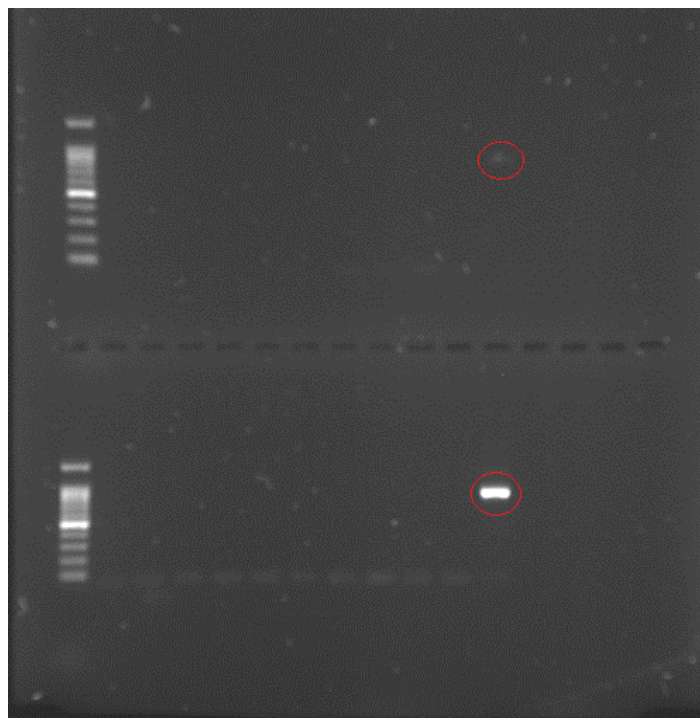
utvrditi brzinu pročišćavanja u pokusnom sustavu pročišćavanja, kao ni odnos između brzine pročišćavanja bakterije *Escherichia coli* i oocista.



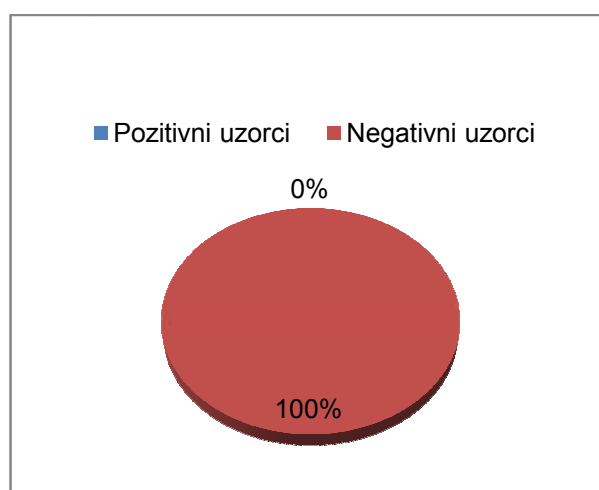
Slika 17. Prikaz rezultata elektroforeze nakon umnožavanja fragmenta 18s ribosomalne RNA *Cryptosporidium* spp. pomoću nested PCR reakcije (0h MGD 1-30). Pozitivna kontrola (DNA referentnog izolata *Cryptosporidium parvum* (CP11)) zaokružena je crvenim krugom.



Slika 18. Prikaz rezultata elektroforeze nakon umnožavanja fragmenta 18s ribosomalne RNA *Cryptosporidium* spp. pomoću nested PCR reakcije reakcijom (12h MGD 1-30). Pozitivna kontrola (DNA referentnog izolata *Cryptosporidium parvum* (CP11)) zaokružena je crvenim krugom.



Slika 19. Prikaz rezultata elektroforeze nakon umnožavanja fragmenta 18s ribosomalne RNA *Cryptosporidium* spp. pomoću nested PCR reakcije reakcijom (24h MGD 1-30 (gornji red) i 48h MGD 1-30 (donji red)). Pozitivna kontrola (DNA referentnog izolata *Cryptosporidium parvum* (CP11)) zaokružena je crvenim krugom.



Slika 20. Udio školjkaša (*Mytilus galloprovincialis*) negativnih na *Cryptosporidium* spp.

Iste rezultate dobili su Tedde i sur. (2013) prilikom istraživanja prisutnosti *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. u dvije vrste školjkaša; *M. galloprovincialis* i *Crassostrea gigas*, namijenjenim ljudskoj prehrani na području Sardinije.

U navedenom istraživanju provedenom na području Sardinije prikupljeno je ukupno 1095 jedinki *M. galloprovincialis* i 240 jedinki *C. gigas* od travnja 2011. do veljače 2012. godine, gdje su autori, za razliku od ovog istraživanja, procjenjivali sezonsku pojavnost nametnika u ove dvije ekonomski važne vrste školjkaša. Školjkaši su prikupljeni s uzgajališta i iz centara za pročišćavanje uz obalu Sardinije, kako bi se osim pojavnosti oocista, odredila valjanosti različitih dijagnostičkih tehnika za otkrivanje i identifikaciju nametnika. Postupak homogenizacije i pripreme tkiva škrge i digestivne žlijezde za daljnje metode pretraživanja (mikroskopija, PCR), bili su jednaki kao i u ovom radu (homogenizacija u otopini PBS, izdvajanje lipida dietil eterom, centrifugiranje 10 min/ 1250 rpm). Autori su dodatno koristili i pozitivnu kontrolu, odnosno tkivo školjkaša umjetno kontaminirano oocistama dobivenih iz fecesa prirodno zaražene teladi i mačaka, kako bi provjerili ispravnost metoda svjetlosne mikroskopije, imunofluorescencije i PCR. Za razliku od kontrolnih uzoraka školjkaša, navedeno istraživanje je također pokazalo nedostatak kontaminacije oocistama *Cryptosporidium* spp. Iako navedeno istraživanje nije uzelo u obzir prisutnost i moguće postojanje korelacije između koncentracije bakterije *Escherichia coli* i nametnika *Cryptosporidium* spp., rezultati pojavnosti pokazali su se jednakim kao u ovom diplomskom radu.

Nadalje, Adell i sur. (2014) su istraživali pristutnosti *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. u kalifornijske dagnje (*Mytilus californianus*) i kalifornijskih morskih lavova (*Zalophus californianus*) u središnjoj Kaliforniji (White Rock, Santa Rosa Creek, Point Lobos, Carmel River i Ano Nuevo Island). U ovom istraživanju u razdoblju od dvije godine, prikupljeno je ukupno 961 jedinki *M. californianus*, od čega 479 za vrijeme sušnog razdoblja (od lipnja do studenog) i 482 za vrijeme vlažnog (od prosinca do svibnja) razdoblja. Iz dagnji je uzeta hemolimfa, a tkivo je homogenizirano u svrhu detekcije *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. Homogenizirano je ukupno 54 uzorka (39 uzoraka iz sušnog razdoblja i 15 uzoraka iz vlažnog razdoblja), a svaki uzorak je podijeljen u tri alikvota pojedinačne veličine 4 g. Tkiva su nakon završetka homogenizacije prosijana kroz stanični filter (sito), te centrifugirana 15 min/ 1000 rpm, što je različito od provedenog predmetnog istraživanja. Nakon obrade homogenata, uzorci su podvrgnuti DNA izolaciji i PCR reakciji. Dodatno je prikupljeno ukupno 961 uzorak hemolimfe dagnji (479 uzoraka sušno razdoblje i 482 uzorka vlažno razdoblje) sa svih pet lokacija i podvrgnuto izolaciji DNA i PCR reakciji. Rezultati su kao i kod prethodnog i predmetnog istraživanja bili negativni.

Iako nije moguće specifično utvrditi razloge ovome bez provođenja dodatnih istraživanja, na nedostatak pozitivne reakcije različiti čimbenici mogu imati upliv; niska

koncentracija oocista u vodi, nepostojanje primarnih izvora kontaminacije vode oocistama, razrjeđenje oocista zbog slatkovodnog dotoka, kao i kemijski (amonijak, pH, salinitet) i fizikalni čimbenici (temperatura i sunčevo zračenje).

Predmetno istraživanje provedeno je početkom toplijeg dijela godine tj. tijekom svibnja kada su se temperature mora kretale od 23 °C do 25 °C, i kada je sunčevo zračenje relativno slabo, te je malo vjerojatno da su sunčeve zrake negativno djelovale na opstanak protozoa, iako su dagnje bile položene na dubinu od 1 m gdje postoji ograničena mogućnost prodora UV zraka (Fleischmann, 1989; Vantrepotte i Melin, 2006). Prilikom postavljanja dagnji na lokaciju, nisu uzeti dodani kemijski i fizikalni parametri mora, budući bi to zahtijevalo dodatne analize. Nedostatak pozitivnog rezultata najvjerojatnije je posljedica izostanka *Cryptosporidium* spp. oocista na specifičnoj lokaciji. Oociste nisu bile prisutne zbog nedostatka primarnog izvora kontaminacije (inficirani ljudi ili domaće životinje) ili su bile prisutne u jako niskoj koncentraciji, te se nisu uspjele akumulirati u dovoljno visokoj koncentraciji u dagnjama tijekom 48 sati izlaganja istih antropogenom utjecaju. U svakom slučaju, negativan nalaz iz predmetnog pokusa sugerira da dagnje ne predstavljaju rizik širenja infekcije *Cryptosporidium* spp. na čovjeka koji ih konzumira termički slabo obrađene.

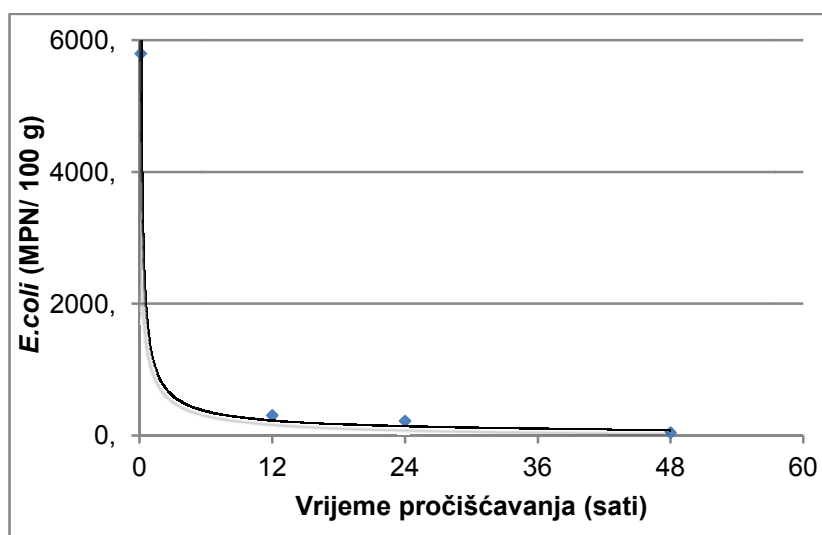
3.2. Određivanje učinkovitosti pročišćavanja *E. coli* u dagnji

Osnovna hrana školjkaša u moru je prirodna planktonska zajednica, čija brojnost u moru znatno premašuje brojnost alohtonih mikroorganizama. Ovaj odnos donekle se mijenja u korist alohtonih mikroorganizama jedino u neposrednoj blizini kanalizacijskih ispusta, gdje je prema legislativi zabranjen uzgoj i izlovljavanje školjkaša (Jozić, 2012). Upravo u blizini kanalizacijskog ispusta (antropogeni utjecaj) postavljeni su pergolari sa školjkašima u svrhu ispitivanja korelacije između koncentracije bakterije *Escherichia coli* i pojavnosti nametnika *Cryptosporidium* spp. u dagnjama. Međutim, taj odnos nije bilo moguće utvrditi uslijed izostanka otkrivanja *Cryptosporidium* spp. u tkivu dagnji nakon 48 sati izlaganja onečišćenju.

Rezultati očitavanja koncentracije *E. coli* u *Mytilus galloprovincialis* su prikazani na Tablici 12, dok je učinkovitost njihovog pročišćavanja tijekom 48 sati prikazana na Slici 21.

Tablica 12. Prikaz koncentracije *E. coli* određenih pomoću MPN tablice.

Vrijeme pročišćavanja (sati)	MPN <i>E. coli</i> /100 g mesa i međuljuštune tekućine		
	R1	R2	R3
0	9200	2400	/
12	490	230	210
24	110	330	230
48	45	20	68



Slika 21. Prikaz smanjenja srednje vrijednosti koncentracije *E. coli* u dagnjama tijekom 48 sati pročišćavanja.

Iz navedenih rezultata možemo primijetiti kako se koncentracija *E. coli* nakon 12 sati pročišćavanja naglo smanjila, nakon čega je uslijedila blaga stagnacija tj. sporiji pad koncentracije *E. coli* u uzorcima koji su pročišćavani 24 i 48 sati (Slika 21). Također se može uočiti da je koncentracija nakon 48 sati pročišćavanja smanjena na iznos manji od najmanje dozvoljene koncentracije za uzgojno područje A (≤ 230 *E. coli*/100 g tkiva i međuljuštune tekućine).

Ho i Tam (2000) su proveli istraživanje učinkovitosti prirodnog pročišćavanja zelene dagnje *Perna viridis* namijenjene za prehranu ljudi na otoku Tap Mun u Kini. Sve prikupljene dagnje su tijekom 48 sati potpuno pročišćene u sustavima za pročišćavanje korištenjem

umjetne morske vode i UV lampe, kako bi se onemogućila kontaminacija školjkaša. Nakon pročišćavanja, školjkaši su postavljeni u četiri pokusna bazena (40 l) koji nisu imali UV lampu, već su bili izloženi sunčevom svjetlu kako bi uvjeti bili što prirodniji. U jednom paru bazena morska voda je bila kontaminirana s *E. coli* u koncentraciji od 2600/100ml, a u drugom u koncentraciji od 290000/100ml. Istim koncentracijama *E. coli* bila je kontaminirana i morska voda u četiri bazena (kontrolni bazeni) u koje školjkaši nisu bili položeni. Gotovo odmah nakon postavljanja školjkaša u jako kontaminiranu vodu bakterije su se koncentrirale u tkivo školjkaša, a najviša koncentracija izmjerena pomoću MPN metode, bila je uočljiva već nakon 3 do 5 sati izlaganja. Potom su školjkaši bili prebačeni u čistu vodu na 55-satno pročišćavanje. Koncentracija *E. coli* je u početku praćena svakih 3 do 5 sati, a kasnije rjeđe. Uspoređujući rezultate predmetnog istraživanja s rezultatima istraživanja Ho i Tam (2000), uočljiv je sličan trend pročišćavanja; u oba slučaja se koncentracija *E. coli* prvo naglo smanjivala, a zatim se usporila. Ujedno, razvidno je i da je koncentracija *E. coli* bilamanja u pokusnim bazenima u kojima su se nalazili školjkaši u odnosu na kontrolne bazene u kojima školjkaši nisu položeni, što navodi na zaključak da se školjkaši mogu ciljano koristiti za pročišćavanje onečišćenih područja obzirom da se hrane filtriranjem vode.

4. ZAKLJUČCI

U ovom je radu istražena prisutnost nametnika *Cryptosporidium* spp., koncentracija *E. coli*, te učinkovitost pročišćavanja *E. coli* u sredozemnoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) izloženoj neposrednom antropogenom utjecaju.

Temeljem dobivenih rezultata zaključuje se sljedeće:

1. Ispitivanje pojavnosti *Cryptosporidium* spp. kod dagnji u području izvora antropogenog utjecaja je dalo negativan rezultat, što dovodi do zaključka da *Cryptosporidium* spp. nije prisutan u tom okolišu, ili da je prisutan u vrlo malim koncentracijama u području izvora antropogenog utjecaja, te je 48 sati izlaganja dagnji izvoru onečišćenja bilo nedovoljno za njegovu akumulaciju u tkivo dagnji.
2. U svrhu detaljnijeg budućeg istraživanja, osim tkiva školjkaša vrijedilo bi prikupiti i hemolimfu prije homogenizacije tkiva dagnji, te izoliranu DNA uzoraka hemolimfe podvrgnuti amplifikaciji polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR), iako ova metoda još uvijek nije referentna za dokazivanje *Cryptosporidium* spp. u matricama hrane. Također bi bilo važno za mjesto istraživanja odabrati područje koje osim kanalizacijskog ispusta kao izvora antropogenog utjecaja ima i uzgajalište domaćih životinja, poglavito goveda, u blizini.
3. Ispitivanje koncentracija *E. coli* kod dagnji u području izvora antropogenog utjecaja dalo je pozitivne i očekivane rezultate, jer su uočene visoke početne koncentracije *E. coli*, čime se da zaključiti da je područje antropogenog utjecaja veliki izvor fekalnog onečišćenja.
4. Ispitivanje učinkovitosti pročišćavanja *E. coli* kod dagnji također je dalo očekivane rezultate. Koncentracija *E. coli* je nakon 12 sati pročišćavanja naglo smanjena, a poslije je uslijedila blaga stagnacija tj. sporiji pad koncentracije *E. coli* tijekom 24 i 48 sati pročišćavanja. Nakon 48 sati pročišćavanja koncentracije *E. coli* smanjena je na iznos manji od najmanje dozvoljene koncentracije za uzgojno područje A ($\leq 230/100$ g tkiva i međuljuštune tekućine), što nas dovodi do zaključka da je učinkovitosti pročišćavanja *E. coli* velika, te da se školjkaši nakon određenih sati pročišćavanja mogu konzumirati.

5. LITERATURA

- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA. 2004. Complete genome sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. Science, 304: 441-445.
- Adell DA, Smith AW, Shapiro K, Melli A, Conrad AP. 2014. Molecular Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Mussels (*Mytilus californianus*) and California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from Central California. Applied and Environmental Microbiology, 80: 7732-7740.
- Anderson BC, Donndelinger T, Wilkins RM, Smith J. 1982. Cryptosporidiosis in a veterinary student. Journal of the American Veterinary Medical Association, 180: 408-409.
- Anderson BC. 1985. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. American Public Health Association, 75: 1433-1434.
- Anonimus 2017. Parasites – *Cryptosporidium* (also known as „Crypto“). Dostupno sa: <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/index.html>, pristupljeno: lipanj, 2018.
- Anonimus 2014. Kriptosporidioza. Dostupno sa: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/crijevniprotozoi/kriptosporidioza>, pristupljeno: lipanj, 2018.
- Bačić T, Erben R, Krajačić M. 2009. Raznolikost živoga svijeta. Školska knjiga, Zagreb, 211 str.
- Barta JR, Thompson RC. 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends in Parasitology, 10: 463-468.
- Baxby D, Blundell N, Hart CA. 1984. The development and preformance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. Journal of Hygiene, 93: 317-323.
- Bayne BL. 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis*. Ophelia, 2: 1-47.
- Bird RG, Smith MD. 1980. Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. The Journal of Pathology, 132: 217-233.
- Bogaerts J, Lepage P, Rouvory D, Vandepitte J. 1987. Cryptosporidiosis in Rawanda. Clinical and epidemiological features. Annales de la Societe belge de medecine tropicale, 67: 157-165.
- Bouchet P, Rocroi JP, Bieler R, Carter JG, Coan EV. 2010. Nomenclator of Bivalve Families with a Classification of Bivalve Families. Malacologia, 52: 1-184.

- Cabada MM, White AC. 2010. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23: 494-499.
- CABI. 2018. *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel). Dostupno sa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/73756>, pristupljeno: lipanj, 2018.
- Caccio MS, Widmer G. 2014. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer, Rim, 564 str.
- Casemore DP, Annstrong M, Sands RL. 1985. Laboratory diagnosis of Cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*. 38: 1337-1341.
- Craft JA, Gilbert JA, Temperton B, Dempsey KE, Ashelford K, Tiwari B, Hutchinson TH, Chipman JL. 2010. Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: tissue-specific expression patterns. Dostupno sa: https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2810337_pone.0008875.g001&req=4, pristupljeno: lipanj, 2018.
- Cross RF, Moorhead PD. 1984. A rapid staining technic for cryptosporidia. *Modern Veterinary Practice*, 65: 307-307.
- Current WL, Long PL. 1983. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *Journal of Infectious Diseases*, 148: 1108-1108.
- Current WL, Haynes TB. 1984. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*, 224: 603-605.
- Current WL, Reese NC. 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33: 98-108.
- Current WL, Upton SJ, Haynes TB. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*, 33: 289-296.
- DAFF. 2012. Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dostupno sa: http://www.nda.agric.za/daaDev/sideMenu/fisheries/03_areasofwork/Aquaculture/BIO DIVERSITY/M.%20galloprovincialis%20BRBA%2012.12.12.pdf, pristupljeno: lipanj, 2018.
- D'Antonio RG, Winn RE, Taylor JP, Gustafson TL, Current WL, Rhodes MM, Gary GW, Zaja RA. 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*, 103: 886-888.
- Djurđević I. 2014. Bakterije porodice *Enterobacteriaceae*. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 20 str.
- Dončević L. 2017. Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 21 str.

- Donovan TJ, Gallacher S, Andrews NJ, Greenwood MH, Graham J, Russell JE, Roberts D, Lee R. 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Communicable Disease and Public Health*, 1: 188-196.
- Downey AS, Chong CR, Graczyk TK, Sullivan DJ. 2008. Efficacy of pyvrium pamoate against *Cryptosporidium parvum* infection *in vitro* and in a neonatal mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 3106-3112.
- Egyed Z, Sreter T, Szell Z, Varga I. 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp. – recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, 111: 103-114.
- Fall A, Thompson RC, Hobbs RP, Morgan RU. 2003. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *Journal of Parasitology*, 89: 399-402.
- Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Santin M, Zhou L, Lal AA, Xiao L. 2003. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitology Research*, 89: 141-145.
- FDA. 2006. FDA Statement on Foodborne *E. coli* O157:H7 Outbreak in Spinach. Dostupno sa: <https://aidsinfo.nih.gov/news/773/fda-statement-on-foodborne-e--coli-o157-h7-outbreak-in-spinach>, pristupljeno: lipanj, 2018.
- Fleischmann ME. 1989. The measurement and penetration of ultraviolet radiation into tropical marine water. *Limnology and Oceanography*, 34: 1623-1629.
- Forgacs P, Tarshis A, Ma P, Federman M, Mele L, Silverman ML, Shea JA. 1983. Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. *Annals of Internal Medicine*, 99: 793-794.
- Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. 2005. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology*, 45: 403-404.
- Gholami P, Lew S Q, Klontz KC. 1998. Raw Shellfish Consumption Among Renal Disease Patients: A Risk Factor for Severe *Vibrio Vulnificus* Infection. *American Journal of Preventive Medicine*, 15: 243-245.
- Gobel E, Brandler U. 1982. Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogony of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistologica*, 18: 331-344.
- Gomez-Couso H, Mendez-Hermida F, Castor-Hermida JA, Ares-Mazes E. 2006. *Cryptosporidium* Contamination in Harvesting Areas of Bivalve Molluscs. *Journal of Food Protection*, 69: 185-190.

- Graczyk KT, Grimes BH, Knight R, DaSilva AJ, Pieniazek NJ, Vela DA. 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synantropic files by combined fluorescent in situ hybridization and monoclonal antibody. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 68: 228-232.
- Gross TL, Wheat J, Bartlett M, O'Connor KW. 1986. AIDS and multiple system involvement with *Cryptosporidium*. The American Journal of Gastroenterology, 81: 456-458.
- Habdija I, Primc HB, Radanović I, Špoljar M, Matoničkin KR., Vujčić KS, Miliša M, Ostojić A, Sertić PM. 2011. Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata: strukture i funkcije. Alfa, Zagreb, 584 str.
- Hart CA, Baxby D, Blundell N. 1984. Shedding of oocysts by immunocompetent individuals with cryptosporidiosis. Journal of Hygiene, 95: 703-709.
- Heijbel H, Slaine K, Seigel B, Wall P, SJ MN, Gibbons W, Istre GR. 1987. Outbreak of diarrhea in a day care center with spread to household members: the role of *Cryptosporidium*. Pediatric Infectious Disease Journal, 6: 532-535.
- Hengl B, Zrnčić S, Oraić D, Gross BA, Beck R. 2017. Molekularni dokazi protozoona *Cryptosporidium hominis* i bičaća *Giardia duodenalis* u uzgoju kamenica (*Ostrea edulis*) i dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) iz Hrvatske. Zbornik sažetaka, 2. Croatian food safety risk assessment conference, Beck R, Hrvatski veterinarski institut, Osijek, str. 58-61.
- Hijjawi SN, Meloni PB, Ryan U, Olson EM, Thompson RC. 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence fot the existance of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. International Journal for Parasitology, 32: 1719-1726.
- Ho WSB, Tam YT. 2000. Natural depuration of shellfish for human consumption: a note of caution. Water Research, 34: 1401-1406.
- Hunter RP, Hadfield JS, Wilkinson D, Lake RI, Harrison DCF, Chalmers MR. 2007. Correlation between Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in Humans and Risk. Emerging Infectious Diseases, 1: 82-88.
- Huzjak F. 1999. Učestalost oocisti protozoona *Cryptosporidium* sp. u izmetinama pasa s područja općine Čazma. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 52 str.
- Iseki M. 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. Japanese Journal of Parasitology, 28: 285-307.
- ISO 16649-3:2015. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of beta glucurodinase – positive *Escherichia coli* – Part 3: Detection and most probable

- number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide. International Organization for Standardization: Stockholm, Švedska.
- Izumi T, Yagita K, Izumiyama S, Endo T, Itoh Y. 2012. Depletion of *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Contaminated Sawage by Using Freshwater Benthic Pearl Clams (*Hyriopsis schlegeli*). Applied and Environmental Microbiology, 78: 7420-7428.
- Janoff NE, Reller BL. 1987. *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. Journal of Clinical Microbiology, 25: 967-975.
- Jirku M, Valigurova A, Koudela B, Krizek J, Modry D, Slapeta J. 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. Folia Parasitologica, 55: 81-94.
- Jokipii L, Pohjola S, Jokipii AM. 1983. *Cryptosporidium*: a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. Lancet, 2: 358-361.
- Jozić S. 2012. Vrijeme zadržavanja indikatora fekalnog onečišćenja u moru i morskim organizmima. Doktorska disertacija, Sveučilište u Splitu i Sveučilište u Dubrovniku, 118 str.
- Jug-Dujaković M, Gavrilović A, Jug-Dujaković J. 2011. Zakonska problematika otpremnih centara za školjkaše u Hrvatskoj. Naše more, 58: 132-139.
- Kijewski T, Wijsman JWM, Hummel H, Wenne R. 2010. Genetic composition of cultured and wild mussels mytilus from the netherlands and transfers from ireland and great britain. Aquaculture, 287: 292-296.
- Koch KL, Shankey TV, Weinstein GS, Dye RE, Abt AB, Current WL. 1983. Cryptosporidiosis in a patient with hemophilia, common variable hypogammaglobulinemia, and the acquired immunodeficiency syndrome. Annals of Internal Medicine, 99: 337-340.
- Kocoshis SA, Cibull ML, Davis TE, Hinton JT, Seip M, Banwell JG. 1984. Intestinal and pulmonary cryptosporidiosis in an infant with severe combined immune deficiency. Journal of Pediatric Gastroenterology, 3: 149-157.
- Krstulović N, Šolić M. 1997. Mikrobiološko zagađenje mora. Hrvatska vodoprivreda, 6: 31-35.
- Krstulović N, Šolić M. 2006. Mikrobiologija mora. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, 317 str.
- Kuna E. 2013. Dinamika koliformnih bakterija u poplavnom području Kopački rit. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 44 str.

- Lasser KH, Lewin KJ, Ryning FW. 1979. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Human Pathology*, 10: 234-240.
- Lazić A. 2016. Uzgoj dagnji u Jadranu. Završni rad, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, 44 str.
- Levine ND. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). *The Journal of protozoology*, 31, 94-98.
- Levine ND, 1985. *Veterinary protozoology*. Elsevier, Iowa, 414 str.
- Levine ND. 1988. *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press, Boca Raton, 224 str.
- Linardić M. 2014. Procjena prilagodbe dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) na genotoksični stres. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 49 str.
- Lindsay DS, Blagburn BL, Hoerr FJ. 1987. Experimentally-induced infections in turkeys with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 48: 104-108.
- MacRae M, Hamilton C, Strachan NJ, Wright S, Ogden ID. 2005. The detection of *Cryptosporidium parvum* and *Escherichia coli* O157 in UK bivalve shellfish. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 395-401.
- Marcial MA, Madara JL. 1986. *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite-membrane-membrane interactions in guinea pig, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology*, 90: 583-594.
- Mašić M. 2004. Higijena i tehnologija prerade školjkaša. *Meso*, 6: 40-45.
- Mathan MM, Venkatesan S, George R, Mathew M, Mathan VI. 1985. *Cryptosporidium* and diarrhoea in southern Indian children. *Lancet*, 2: 1172-1175.
- Matić J. 2009. Patogene bakterije u hrani. Dostupno sa: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/patogene-bakterije-u-hrani-12>, pristupljeno: lipanj, 2018.
- Matonićkin I, Habdija I, Primc HB. 1998. Beskralješnjaci: biologija nižih avvertebrata. Školska knjiga, Zagreb, 691 str.
- Meisel JL, Perera DR, Meligaro C, Rubin CE. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70: 1156-1160.
- Miller AW, Gardner AI, Atwill RE, Conrad AP. 2006. Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*). *Journal of Microbiological Methods*, 65(3): 367-379.

- Mladineo I, Trumbić Ž, Jozić S, Šegvić T. 2009. First report of *Cryptosporidium* sp. (Coccidia, Apicomplexa) oocysts in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) reared in the Mali Ston Bay, Adriatic Sea. *Journal of Shellfish Research*, 28: 541-546.
- Mladineo I, Trumbić Ž, Beck R, Popović Z, Peharda Uljević M. 2011. *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. isolated for the first time in warty venus (*Venus verrucosa*) from Kaštela Bay, Adriatic Sea. *Zbornik sažetaka, 15th EAFP Conference on Diseases of Fish and Shellfish*, Mladineo I, Dalmacijapapir, Split, str. 288-288.
- Molbak K, Aaby P, Hojlyng N, da Silva AP. 1994. Risk factors for *Cryptosporidium* diarrhea in early childhood: a case-control study from Guinea-Bissau, West Africa. *American Journal of Epidemiology*, 139: 734-740.
- Molini U, Traversa D, Ceschia G, Iorio R, Boffo L, Zentilin A, Capelli G, Giangaspero A. 2007. Temporal occurrence of *Cryptosporidium* in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in northern Adriatic Italian lagoons. *Journal of Food Protection*, 70: 494-499.
- Montessori GA, Bischoff L. 1985. Cryptosporidiosis: a cause of summer diarrhea in children. *Canadian Medical Association Journal*, 132: 1285-1285.
- Moon HW, Woodmansee DB, Harp JA, Abel S, Ungar BL. 1988. Lactal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: immune dams do not protect their suckling pups. *Infection and Immunity*, 56: 649-653.
- Ng J, Yang R, McCarthy S, Gordon C, Hijjawi N, Ryan U. 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Veterinary Parasitology*, 176: 145-150.
- Nime FA, Burke JD, Page DL, Holcher MA, Yardley JH. 1976. Acute enterocolitis in a human infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592-598.
- O'Donoghue JP. 1985. *Cryptosporidium* infection in man, animals, birds and fish. *Australian Veterinary Journal*, 62: 253-258.
- O'Donoghue JP, Tham LV, Saram GW, Paull LK, McDermott S. 1987. *Cryptosporidium* infection in birds and mammals and attempted cross-transmission studies. *Veterinary Parasitology*, 26: 1-11.
- Oliveira J, Cunha A, Castilho F, Romalde JL, Pereira MJ. 2011. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives- A mini-review. *Food Control*, 22: 805-816.
- Pešo T, Huzjak F, Marinculić A, Bosnić S, Rajković R, Duraković E. 2001. Nalaz protozoona *Cryptosporidium* spp. u pasa na području Republike Hrvatske. *Zbornik sažetaka*,

- Croatian and Slovenian symposium on microbiology and infectious diseases. „Zoonoses diseases today and tomorrow“, Prukner-Radovčić E, Presečki V, Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, str. 58-58.
- Petry F. 2004. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum* (review article). Microscopy and Microanalysis, 10: 586-601.
- Pitlik SD, Fainstein V, Garza D, Guarda L, Bolivar R, Rios A, Hopfer RL, Mansell PA. 1983. Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. Archives of Internal Medicine, 143: 2269-2275.
- Plutzer J, Karanis P. 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. Veterinary Parasitology, 165: 187-199.
- Pohlenz J, Bemrick JW, Moon WH. 1987. Bovine Cryptosporidiosis: A Transmission and Scanning Electron Microscopic Study of Some Stages in the Life Cycle and of the Host-Parasite Relationship. Veterinary Pathology, 15: 417-427.
- Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla. 2007. Narodne novine 99, Zagreb.
- Rajković R, Bosnić S, Granić J, Brlek K. 1997. Kriptosporidioza u teladi. Zbornik sažetaka, Veterinarski dani '97, Blenović T, Hrvatska veterinarska komora, Cavtat, str. 119-123.
- Rajković R, Rimac D, Dragičević P, Bosnić S, Gojmerac T, Vinković B. 2008. Proširenost gastrointestinalnih parazita u lovačkih pasa u ruralnim dijelovima istočne Hrvatske. Veterinarska stanica, 39: 19-31.
- Razić M. 2017. Mikroorganizmi u školjkašima kao potencijalna opasnost za zdravlje ljudi, Seminarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 15 str.
- Reese NC, Current WL, Ernst JV, Bailey WS. 1982. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rates. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 31: 226-229.
- Robertson LJ, Gjerde BK. 2007. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries. Trends in Parasitology, 23: 344-347.
- Robertson LJ. 2014. *Cryptosporidium* as a Foodborn Pathogen. Springer, Oslo, 90 str.
- Rogers K. 2011. Bacteria and viruses. Britannica Educational Publishing, New York, 240 str.
- Rosales MJ, Cordon GP, Moreno MS, Sanchez CM, Mascaro C. 2005. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. Acta Tropica, 95: 74-78.
- Ryan U, Fayer R, Xiao L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. Parasitology, 141: 1667-1685.
- Schets MF, Berg LJHH, Roda Husman MA, Engels BG, 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* in comercial and non-comercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from

- Oosterschelde, The Netherlands. International Journal of Food Microbiology, 113: 189-194.
- Shapiro K, Miller WA, Silver MW, Odagiri M, Largier JL, Conrad PA, Mazet JA. 2013. Research commentary: association of zoonotic pathogens with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. Microbial Ecology, 65: 928-933.
- Slavin D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). Journal of Comparative Pathology, 65: 262-266.
- Sloper SK, Dourmashkin RR, Bird BR, Slavin G, Webster BDA. 1982. Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency. Gut, 23: 80-82.
- Tedde T, Piras G, Salza S, Nives RM, Sanna G, Tola S, Culurgion J, Piras C, Merella P, Garippa G, Virgilio S. 2013. Investigation into *Cryptosporidium* and *Giardia* in bivalve mollusks farmed in Sardinia region and destined for human consumption. Italian Journal of Food Safety, 2: 91-93.
- Tyzzer EE. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, 5: 12-13.
- Tzipori S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiological Reviews. 47: 84-96.
- Tzipori S. 1985. *Cryptosporidium*: Notes on epidemiology and pathogenesis. Parasitology Today, 1: 159-165.
- Tzipori S. 1988. Cryptosporidiosis in Perspective. Advances in Parasitology, 27: 63-129.
- Tzipori S, Widmer G. 2000. The Biology of *Cryptosporidium*. Contributions to microbiology, 6: 1-32.
- Upton SJ, Current WL. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. Journal of Parasitology, 71: 625-629.
- Vantrepotte V, Melin F. 2006. UV penetration in the water column. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 67 str.
- Veršec P. 2016. Učestalost bičša *Giardia duodenalis* u uzgajalištima dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenica (*Ostrea edulis*) u Republici Hrvatskoj. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 42 str.
- Vetterling JM, Takeuchi A, Madden PA. 1971. Ultrastructure of *Cryptosporidium wairi* from the guinea pig. The Journal of Protozoology, 18: 248-260.
- Weber J, Philip S. 1983. Human cryptosporidiosis. New England Journal of Medicine, 308: 1252-1257.

- Widmer G, Sullivan S. 2012. Genomin and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology*, 34: 61-71.
- Willis JE, McClure J, Davidson J, McClure C, Greenwood SJ. 2013. Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: should Canada take a closer look. *Food Research International*, 52: 119-135.
- Wittman R J, Flick G J. 1995. Microbial contamination of shellfish: Prevalence, risk to human health, and control strategies. *Annual Review of Public Health*, 16: 123-140.
- Wolfson JS, Richter JM, Waldron MA. 1984. Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *New England Journal of Medicine*, 312: 1278-1282.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 72-97.
- Xiao L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124: 80-90.
- Zhu G, Marchewka MJ, Keithly JS. 2000. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*, 146: 315-321.

6. PRILOZI

Prilog 1. Tablica za očitavanje najvjerojatnijeg broja *E. coli* u školjkašima (prema Jozić,. 2012).

Broj epruveta sa pozitivnom reakcijom			
5 epruveta sa			MPN/100 g
1 g	0.1 g	0.01 g	
0	0	0	<20
0	0	1	20
0	1	0	20
0	2	0	40
1	0	0	20
1	0	1	40
1	1	0	40
1	1	1	60
2	0	0	50
2	0	1	70
2	1	0	70
2	1	1	90
2	2	0	90
2	3	0	120
3	0	0	80
3	0	1	110
3	1	0	110
3	1	1	140
3	2	0	140
3	2	1	170
3	3	0	170
4	0	0	130
4	0	1	170

Nastavak Priloga 1.

Broj epruveta sa pozitivnom reakcijom			MPN/100 g
5 epruveta sa			
1 g	0.1 g	0.01 g	
4	1	0	170
4	1	1	210
4	1	2	260
4	2	0	220
4	2	1	260
4	3	0	270
4	3	1	330
4	4	0	340
5	0	0	230
5	0	1	310
5	0	2	430
5	1	0	330
5	1	1	460
5	1	2	630

Nastavak Priloga 1.

Broj epruveta sa pozitivnom reakcijom			MPN/100 g
5 epruveta sa			
1 g	0.1 g	0.01 g	
5	2	0	490
5	2	1	700
5	2	2	940
5	3	0	790
5	3	1	1100
5	3	2	1400
5	3	3	1800
5	4	0	1300
5	4	1	1700
5	4	2	2200
5	4	3	2800
5	4	4	3500
5	5	0	2400
5	5	1	3500
5	5	2	5400
5	5	3	9200
5	5	4	16000
5	5	5	>18000