Učestalost bičaša Giardia duodenalis u uzgajalištima dagnji (Mytilus galloprovincialis) i kamenica (Ostrea edulis) u Republici Hrvatskoj

Veršec, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:354830

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Petra Veršec
693/USH

UČESTALOST BIČAŠA *Giardia duodenalis* U UZGAJALIŠTIMA DAGNJI (*Mytilus galloprovincialis*) I KAMENICA (*Ostrea edulis*) U REPUBLICI HRVATSKOJ

Rad je izrađen u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti na Odjelu za bakteriologiju i parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sanje Vidaček, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Relje Becka, voditelja Laboratorija za parazitologiju Hrvatskog Veterinarskog instituta u Zagrebu.

Zahvaljujem dr. sc. Relji Becku na pruženoj prilici i Mariji Stublić na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela.

Od srca hvala izv. prof. dr. sc. Sanji Vidaček na pomoći, savjetima i lijepim riječima tijekom izrade ovog rada.

Najveću zahvalnost izražavam svojim roditeljima jer su mi pružili priliku da se školujem i Maji i Ivani za sve molitve, ohrabrenja i zabavne trenutke.

Posebna hvala Kreši za predispitna bdjenja i što me pratio na ovom putu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UČESTALOST BIČAŠA Giardia duodenalis U UZGAJALIŠTIMA DAGNJI (Mytilus galloprovincialis) I KAMENICA (Ostrea edulis) U REPUBLICI HRVATSKOJ

Petra Veršec, 693/USH

Sažetak: *Giardia duodenalis* ubikvitarna je intestinalna protozoa koja uzrokuje infekcije ljudi i životinja. Može se prenijeti hranom ili vodom. Cilj ovog rada bio je ispitati njenu prisutnost u uzgajalištima školjkaša u Hrvatskoj. Uzorci probavne žlijezde dagnji i kamenica sakupljenih s trinaest uzgajališnih područja, analizirani su metodom ugniježđene lančane reakcije polimerazom i neposrednim sekvencioniranjem trioza fosfat izomeraza gena. Sva ispitivana uzgajališna područja sadržavala su ciste *G. duodenalis* te je 6,1 % školjkaša bilo pozitivno. Učestalost je varirala ovisno o vrsti školjke i lokaciji iz koje je uzorak uzet. Ustanovljena je prisutnost četiri genske skupine ovog parazita, a to su A, B, C i E. Najčešća je bila skupina A, odnosno pripadajuća podskupina AI.

Ključne riječi: dagnje, *Giardia duodenalis*, kamenice, ugniježđeni PCR

Rad sadrži: 42 stranice, 8 slika, 6 tablica, 71 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Sanja Vidaček*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Relja Beck*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv. prof. dr. sc. *Ksenija Markov*
2. Izv. prof. dr. sc. *Sanja Vidaček*
3. Doc. dr. sc. *Marina Krpan*
4. Izv. prof. dr. sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology Engineering
Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

PREVALENCE OF THE FLAGELLATE Giardia duodenalis IN MUSSELS (*Mytilus galloprovincialis*) AND OYSTERS (*Ostrea edulis*) FARMS FROM CROATIA

Petra Veršec, 693/USH

Abstract: *Giardia duodenalis* is ubiquitous intestinal protozoa which infects both humans and animals. It can be transmitted through food or water. The aim of this study was the investigation into its presence in shellfish farms from Croatia. Samples of mussels` and oysters` digestive gland, collected from thirteen different farming areas, were analysed by nested Polymerase Chain Reaction, followed by direct sequencing of triosephosphate isomerase gene. All tested farming areas contained *Giardia* cysts, and 6,1 % of shellfish were positive. Prevalence varied depending on the type of shellfish and locations from which the samples were taken. Four assemblages of this parasite were identified: A, B, C and E. The most common was assemblage A, or more specifically subassemblage AI.

Keywords: mussels, *Giardia duodenalis*, oysters, nested PCR

Thesis contains: 42 pages, 8 figures, 6 tables,71 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Sanja Vidaček, Associate professor*

Technical support and assistance: *PhD. Relja Beck*

Reviewers:
1. PhD. *Ksenija Markov,* Associate professor
2. PhD. *Sanja Vidaček,* Associate professor
3. PhD. *Marina Krpan,* Assistant professor
4. PhD. *Ksenija Marković,* Associate professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2016

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. OBILJEŽJA RODA *Giardia* 2

2.1.1. Razvojni ciklus giardija 3

2.2. SISTEMATIZACIJA RODA *Giardia* 4

2.2.1. Giardia duodenalis 5

2.3. IDENTIFIKACIJA GIARDIJA 6

2.3.1. Dosadašnja istraživanja 7

2.4. GIARDIOZA 8

2.4.1. Giardioza ljudi 8

2.5. ŠKOLJKAŠI 9

2.5.1. Dagnja 9

2.5.2. Kamenica 10

2.5.3. Stavljanje školjkaša na tržište 12

2.5.4. Bolesti koje prenose školjkaši 13

2.5.4.1. Školjkaši kao prijenosnici G. duodenalis 14

3. EKSPERIMENTALNI DIO 15

3.1. MATERIJALI 15

3.2. METODE RADA 16

3.2.1. Molekularna karakterizacija 16

3.2.1.1. Izdvajanje parazitske DNA 16

3.2.1.2. Postupak izdvajanja parazitske DNA 17

3.2.1.3. Umnažanje ciljanog odsječka tpi gena lančanom reakcijom polimerazom (PCR) 18

3.2.1.4. Kapilarna elektroforeza 20

3.2.1.5. Pročišćavanje proizvoda PCR-a 20

3.2.1.6. Određivanje nukleotidnog slijeda odsječka tpi gena 21

3.2.1.7. Analiza slijeda nukleotida odsječka tpi gena 21

4. REZULTATI I RASPRAVA 22

5. ZAKLJUČCI 35

6. LITERATURA 36

1. UVOD

Hrana iz mora oduvijek je vrlo cijenjena, a stavljanjem sve većeg naglaska u suvremenom društvu na pravilnu, raznovrsnu prehranu temeljenu na mediteranskom tipu, njena je vrijednost porasla. Važan segment toga čine živi školjkaši, koji se konzumiraju u sirovom ili blago toplinski obrađenom stanju, što ih s jedne strane svrstava u delicije, a s druge ih ubraja u kategoriju zdravstveno rizične hrane.

Za naše su tržište najznačajnije dagnje i kamenice koje su, zbog svojih iznimnih senzorskih svojstava, posjedovanja visokokvalitetnih bjelančevina, mineralnih tvari te u slučaju kamenica i vitamina i esencijalnih aminokiselina, izvrsne namirnice za prehranu ljudi (Mašić, 2004).

Obzirom da se prehranjuju filtriranjem vode, osim stroge higijenske prakse prilikom sakupljanja i manipuliranja školjkašima, veliku pozornost treba obratiti i na pravovremeno uočavanje bolesnih školjkaša te provoditi kontrole prije stavljanja u promet. Hrvatsko se zakonodavstvo uglavnom orijentiralo na bakterije, dok je ispitivanje prisutnosti parazita stavljeno u drugi plan, čime postoji mogućnost ugrožavanja zdravlja potrošača.

Primjer parazita koji se može naći u probavnoj žlijezdi školjkaša jest zasigurno *Giardia duodenalis*, protozoa koja parazitira kralješnjake, uključujući i čovjeka. U more može dospjeti zbog divljih životinja, ali i otpadnim i površinskim vodama kontaminiranim cistama.

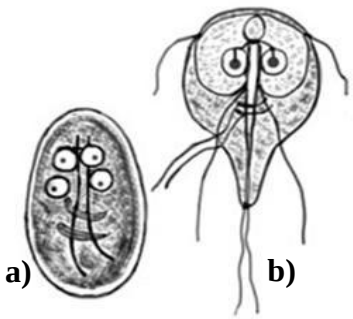
Cilj rada bio je ispitati prisutnost i podrijetlo *G. duodenalis* u dagnjama i kamenicama iz Jadranskog mora, tim više što ovakav tip istraživanja do sada još nije proveden na ovom prostoru.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OBILJEŽJA RODA *Giardia*

Vrste roda *Giardia* flagelatni su protozoe koji pripadaju porodici *Hexamitidae* i rodu *Diplomonadida* (ITIS, 2016). Svojstvene su im dvije slične, transkripcijski aktivne diploidne jezgre, nedostatak mitohondrija, peroksisoma i Golgijevog aparata te posjedovanje ventralnog prianjajućeg diska (Thompson, 2009). Vegetativna faza zove se trofozoit (Slika 1b) kojeg čini tijelo oblika suze ili polovice kruške, prosječne dužine 12-15 μm i širine 5-9 μm. Sadrži četiri para bičeva, anteriorne (prednje), lateralne (zadnje bočne), kaudalne (repne) i ventralne (trbušne). Citoskeletom dominira protein tubulin, a unutar stanice nalazi se ishodišna točka svih flagela te funisa, tj. niza mikrotubula koji okružuju aksoneme repnih bičeva i sudjeluje u pokretanju stanice. Medijalno tijelo trofozoita sastoji se od nekoliko snopića koje tvore mikrotubuli, a snopići su povezani u veće skupine. Pritom je prisutna velika varijabilnost u veličini medijalnog tijela kao posljedica različitog stupnja polimerizacije mikrotubula, što se može koristiti i kao taksonomski kriterij (Benchimol, 2009).

Trofozoit je neinvanzivni oblik koji se u organizmu pričvršćuje na mukozne stanice tankog crijeva gdje se umnožava (Sprong i sur., 2009). Dvije jezgre daju prepoznatljiv izgled trofozoitima, koji podsjeća na lice (Shalaby i Wakid, 2014). *Giardia* ima sposobnost proizvodnje cista (Slika 1a), nepokretnih invazivnih oblika koji se izlučuju fecesom domaćina, a karakterizira ih binarna dioba parazita. Prosječna veličina ciste je 8-12 μm × 4-10 μm (Marinculić i Beck, 2009). Obično su ovalnog oblika s četiri jezgre smještene na jednom kraju, filamentnim aksonemama i parabazalnim (medijalnim) tjelešcima (Shalaby i Wakid, 2014). Značajka cista je u tome što su nakon ekskrecije trenutno infektivne, u odgovarajućim su uvjetima stabilne u okolišu mjesecima, a infektivna doza za ljude iznosi 10 do 100 cisti (Almeida i sur., 2011).



Slika 1. Cista (a) i trofozoit (b) parazita *Giardia duodenalis* (Johnson, 2012)

2.1.1. Razvojni ciklus giardija

Životni ciklus giardija je kružni, pri čemu se izmjenjuju stanja u kojima se giardije nalaze, a ovisno o tome i stupanj invazivnosti. Ciste su otporni oblik zadužen za daljnju transmisiju, a uvriježeno je mišljenje kako su infektivne čim dospiju u feces, iako u nekim slučajevima sazrijevanje ciste može trajati i do sedam dana. Iako se trofozoiti također mogu naći u fecesu, ne smatraju se infektivnim stadijem jer je njihovo preživljavanje u okolišu kratkotrajno. Međutim, u slučaju jake dijareje ukoliko je velik broj trofozoita izbačen iz tijela tako da kontaminira osobe ili površine, moguće je da uzrokuju infekciju. Ciste naprotiv, zahvaljujući svojoj izdržljivosti u sličnim situacijama iniciraju infekcije te uzrokuju dugoročne kontaminacije radnih površina, tijela životinja kao i kontaminaciju okoliša (Thompson i Monis, 2012).

Sama infekcija odvija se gutanjem cista iz kontaminirane vode, hrane ili fekalno – oralnim putem (prljavim rukama ili drugim kontaminiranim površinama). Zatim u tankom crijevu dolazi do ekscistacije, procesa kada iz jedne ciste nastaju dva trofozoita (CDC, 2015). Između ta dva stadija, nakratko se javlja stadij rano ekscistiranih trofozoita, kratkoživućih ovalnih oblika s metabolizmom koji ima obilježja između ciste i trofozoita (Bernander i sur., 2001). Potpuno razvijeni trofozoiti se potom dijele longitudinalnom binarnom fisijom te ostaju slobodni ili prianjaju na mukozne stanice tankog crijeva pomoću diska. Nakon toga slijedi druga faza, encistacija, kada trofozoit prelazi u cistu i odvija se uglavnom u debelom crijevu (CDC, 2015).

Proces ekscistacije uzrokovan je izlaganjem cista niskom pH želuca, dok je encistacija *in vivo* potaknuta prisutnošću žučnih soli i kolesterola te blago alkalnim uvjetima u tankom crijevu (Lauwaet i Gillin, 2009; Birkeland i sur., 2010). Unatoč sposobnosti trofozoita da kolonizira tanko crijevo kroz dulji period, encistacija je nužna posljedica protoka intestinalnih tekućina koje nose trofozoit dalje kroz probavni sustav, kako bi parazit preživio izvan domaćina, u čemu ključnu ulogu ima stanična stjenka s dvojakom funkcijom zaštite parazita u okolišu i propuštanjem signala od organizma domaćina (Lauwaet i Gillin, 2009).

2.2.SISTEMATIZACIJA RODA *Giardia*

Ime roda ustanovljeno je još 1882. godine, kada je Kunstler u probavnom sustavu punoglavaca iz roda Anura (žabe) pronašao bičaše. Predložen je i naziv Lamblia kao spomen na Lambla koji je prvi dao točan opis parazita. S vremenom se tražio način kojim bi se mogle imenovati vrste te je odbačena mogućnost da se podjela temelji na razlikama u domaćinima ovog parazita, već je zaključeno kako treba biti na osnovu morfoloških i ultrastrukturnih razlika. Koristeći taj kriterij, *Giardia* je prvotno bila podijeljena u tri grupe organizama (Thompson i Monis, 2004).

Prva je *G. duodenalis* koja se odlikuje kruškolikim trofozoitima te medijalnim tijelom nalik kandžama ili čekiću, zatim *G. muris* s okruglim trofozoitima i medijalnim tijelom, i *G. agilis* čiji su trofozoiti dugački i uski s kratkim adhezivnim diskovima i dugačkim medijalnim tijelom (Thompson i Monis, 2004).

Danas se, ovisno o morfologiji, *Giardia* dijeli na šest vrsta, a osim već spomenutih to su i *G. ardeae, G. psittaci* i *G. microti* (Cacciò i sur., 2010). Također, postoji preklapanje nekih vrsta u određenim karakteristikama, na način da *G. psittaci* ima oblik trofozoita i medijalnog tijela sličan *G. duodenalis*, a manjka joj ventrolateralni utor, dok *G. ardae* može imati oblik trofozoita sličan onome kod *G. duodenalis* ili pak *G. muris*. Jedino je *G. microti* opisana na temelju morfologije cista koje se sastoje od dva diferencirana trofozoita i ventralnog diska (Thompson i Monis, 2004). Domaćini svih giardija su brojni kralješnjaci, što prikazuje Tablica 1.

Tablica 1. Sistematizacija giardija prema morfološkom kriteriju i domaćini parazita (Cacciò i sur., 2010)

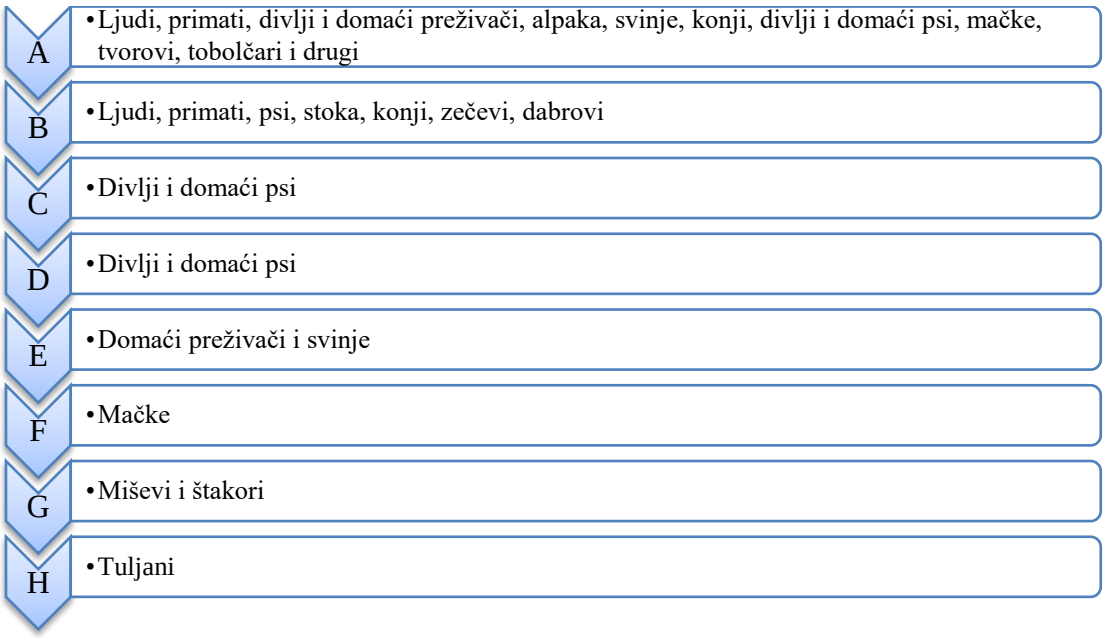
Vrsta	Organizam domaćin
Giardia agilis	Vodozemci
Giardia ardeae	Ptice
Giardia psittaci	Ptice
Giardia microti	Glodavci
Giardia muris	Glodavci
Giardia duodenalis	Sisavci

Uz to, nedostatak značajnih morfoloških razlika između genetskih varijanci *G. duodenalis* pronađenih u sisavaca, imao je za posljedicu podjelu te vrste na više genskih skupina, temeljenu na genetskim razlikama (Smith i sur., 2007).

2.2.1. Giardia duodenalis

Giardia duodenalis, često u literaturi spominjana i kao *G. lamblia* te *G. intestinalis*, najčešći je uzročnik parazitarnih infekcija prenošenih vodom među ljudima diljem svijeta (Buret i sur., 2015). Parazitira kopnene i vodene sisavce, kao i ribe, a jedina je vrsta koja može zaraziti i čovjeka (Beck i sur., 2011).

Do sada je prepoznato osam različitih genskih skupina unutar ove vrste:



te je alozimska analiza pokazala kako genske skupine A i B koje parazitiraju i čovjeka, obuhvaćaju još najmanje četiri genetske grupe. To su grupe AI, AII, BIII i BIV, iako postoje istraživanja koja su potvrdila postojanje i AIII grupe, koja ne uzrokuje infekciju ljudi (Feng i Xiao, 2011). Time su giardije prepoznate kao antropo-zoonotski paraziti (Buret i sur., 2015).

Kliničke studije pokazuju kako je genska skupina A manje rasprostranjena nego B, no infekcija je više simptomatska te se A skupina češće povezuje sa životinjama domaćinima koji služe kao spremnik za infekciju ljudi (Jiménez-Cardoso i sur., 2012).

2.3.IDENTIFIKACIJA GIARDIJA

Za razliku od bakterija koje se u ispitivanim uzorcima nalaze u puno većem broju, detekcija i identifikacija protozoa je puno zahtjevnija zbog njihove manje količine prirodno prisutne u okolišu. Najčešće tradicionalne analize provode se u uzorku fecesa te voda kontaminiranih fecesom, a tradicionalne metode temelje se na fluorescentno obilježenim imunološkim testovima kombiniranim s fluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom te su takve analize dugotrajne, skupe i zahtijevaju visoko educirano osoblje (Toze, 1999). Korištenje svjetlosne mikroskopije u analizi fecesa dosta je nepouzdano zbog malog broja cista u stolici kao i mogućeg neiskustva laboratorijskih tehničara, unatoč mogućnosti koncentriranja uzorka primjerice cink sulfatom (Morgan, 2000).

Kako su epidemije izazvane hranom i kontaminiranom vodom, kojima je uzročnik *Giardia*, učestale zemljama u razvoju, ali i razvijenim zemljama, tražile su se nove metode kojima bi se giardije mogle efikasno detektirati. Zahtjevi su bili visoka učinkovitost, robusnost i održivost metoda, sve veće svijest i razumijevanje načina kontaminacije parazita utjecala je na razvoj boljih metoda otkrivanja (Morgan, 2000). Stoga su u posljednjih petnaestak godina kao alternativne metode prihvaćene direktni testovi s fluorescentno obojenim antitijelima te određivanje antigena ELISA (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay) metodom (Verweij i sur., 2004).

U slučaju izolata *G. duodenalis*, gdje su morfološke razlike nezamjetne, potrebna je genetička karakterizacija koja se postiže metodom lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction – PCR) i direktnim sekvencioniranjem dijelova gena ssrRNA, β-giardina, trioza-fosfat izomeraze i glutat dehidrogenaze (Cacciò i sur., 2008). Lančana reakcija polimerazom omogućava umnožavanje ciljanih dijelova DNA na specifičan, osjetljiv, brz i točan način, koji omogućuje da se detektiraju veoma male količine ciljane nukleinske kiseline u uzorku, pri čemu je metoda samo potvrdna (Toze, 1999). Povećanje osjetljivosti PCR metode postiže se tzv. ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom (engl. nested PCR) koja omogućuje umnožavanje već umnoženih gena, čime se postiže 100 %-tna osjetljivost na četiri ciste ili pak 80 %-tna osjetljivost na samo jednu cistu (Miller i Sterling, 2007). Uvođenje metoda temeljenih na PCR-u bilo je otežano zbog mogućih poteškoća u ekstrakciji DNA iz ispitivanih uzoraka, kontaminaciji DNA te cijene postupka, no te su prepreke do sada minimizirane (Verweij i sur., 2004). Često se koristi i analiza polimorfizma dužine restrikcijskih ulomaka (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) (Feng i Xiao, 2011).

Iako su primjenjive metode brojne, može se zaključiti kako u novije vrijeme prevladava upotreba molekularnih dijagnostičkih metoda, a njihova konačna učinkovitost ovisi o ciljanim genima, broju lokusa korištenih u analizi i specifičnosti testa (Feng i Xiao, 2011).

2.3.1. Dosadašnja istraživanja

S obzirom na utjecaj giardija na čovjeka te učestalost pojave zoonoze, česta su ispitivanja kojima je cilj utvrditi prisutnost giardija u uzorku kao i genotipizacija. Tablica 2 prikazuje neka do sada provedena istraživanja, iz čega se može vidjeti kako se analize najčešće provode na izolatima fecesa životinja.

Tablica 2. Primjeri određivanja prisutnosti giardija

Uzorak	Domaćin	Reference
Izolati fecesa	Pas	Sommer i sur., 2015; Beck i sur., 2012
	Sisavci iz zoološkog vrta	Beck i sur, 2011
	Sisavci iz divljine	Beck i sur., 2010
	Domaće životinje, divlje životinje, primati iz zatočeništva i čimpanze, čovjek	Cacciò i sur., 2008
	Mačka	Papini i sur., 2007
	Telad	Geurden i sur., 2008
Otpadne vode		Giangaspero i sur., 2009
Hemolimfa	Školjkaši	Giangaspero i sur., 2009
Škrge i gastro-intestinalni trakt	Školjkaši	Gómez-Couso i sur., 2004; Schets i sur., 2007
Površinske vode i voda iz slavine		Feng i sur., 2011; Castro-Hermida i sur., 2009

Istraživanje (Manser i sur., 2013) provedeno na ukupno osamnaest parazitarnih ili kliničkih europskih laboratorija zaduženih za provođenje rutinskih dijagnostičkih metoda pokazalo je kako se u određivanju cista *Giardia* upotrebljavaju svjetlosna mikroskopija, mikroskopija fluorescirajućih antitijela, antigen imunotestovi i PCR. Najčešće se koristila

kombinacija koncentriranja cista iz uzoraka, popraćena mikroskopijom, iako se PCR pokazao kao osjetljivija metoda te je i limit detekcije cista varirao ovisno o laboratoriju.

2.4. GIARDIOZA

Giardije su jedne od najčešćih intestinalnih parazita u ljudi kao i čest uzrok enteritisa u domaćih i divljih životinja (Feng i Xiao, 2011). Bolest koju izazivaju naziva se giardioza i povezuje se s vrstom *G. duodenalis* (Buret i sur., 2015). Parazit uzrokuje infekciju probavnog trakta domaćina, a važna značajka bolesti su nejednoliko izraženi simptomi pa se bolest može manifestirati kao simptomatska ili asimptomatska (Roxström-Lindquist i sur., 2006). Glavni domaćini su ljudi, stoka, psi, mačke te neki divlji i morski sisavci, a na rasprostranjenost bolesti utječu socijalni, ekonomski, klimatski i okolišni faktori. Tako se giardioza češće povezuje s prenapučenim i siromašnijim mjestima, s nedostatkom čiste vode i lošim kanalizacijskim sustavom (Shalaby i Wakid, 2014).

Brojni su čimbenici koji utječu na varijabilnost bolesti poput stanja imunološkog sustava domaćina, njegove dobi, spola i prehrambenog statusa, ali i genotipa soja parazita, infektivne doze i moguće ko-infekcije (Roxström-Lindquist i sur., 2006).

2.4.1. Giardioza ljudi

Giardiozu ljudi izaziva *G. duodenalis* i to genske skupine A i B, a transmisija se može odvijati fekalno – oralnim putem ili gutanjem parazitarnih cista u kontaminiranoj vodi i hrani (Tungtrongchitr i sur., 2010). Ukoliko čovjek stekne infekciju putem kontaminirane vode ili hrane, riječ je o indirektnom putu infekcije, dok se u slučaju prijenosa bolesti s čovjeka ili životinje na drugog čovjeka radi o direktnom putu (Abeywardena i sur., 2015).

Izvore i transmisiju giardioze ponekad je teško otkriti zbog ubikvitarne prirode parazita, kao i raznih načina prijenosa. Period inkubacije za giardije je 3 dana do 6 tjedana. Visokorizične skupine su dojenčad, djeca i osoblje u vrtićima, imunokompromitirani ljudi, poljoprivrednici, ostali ljudi koji se bave životinjama te međunarodni putnici. *Giardia* obično kolonizira dvanaesnik i jejunum tankog crijeva i uzrokuje, ovisno o soju, apoptozu enterocita što može rezultirati gubitkom funkcije i propusnošću epitelne barijere. Značajka kronične giardioze je i akumulacija tekućina u intestinalnom lumenu kao posljedica prekomjernog

izlučivanja klorida. Klinički znakovi giardioze uključuju akutni ili kronični proljev, bolove u trbuhu, mučninu, povraćanje i gubitak na težini. Vezanje trofozoita za crijevne epitelne stanice također uzrokuje i aktivaciju limfocita, skraćivanje mikrovila i malapsorpciju (Abeywardena i sur., 2015).

60-80 % infekcija povezanih s *G. duodenalis* je asimptomatsko. Kronična giardioza također može utjecati na dugotrajno zaostajanje u rastu zbog nutritivne deficijencije. Simptomatska giardioza najčešće je vezana za djecu zbog nedovoljno razvijenog imuniteta te starije osobe zbog oslabljenog imuniteta (Tungtrongchitr i sur., 2010).

Bolest češće pogađa zemlje u razvoju gdje je prosječna učestalost 20 %, od razvijenih zemalja s prosječnom učestalošću od 5 % (Roxström-Lindquist i sur., 2006). Tako je primjerice na Tajlandu rasprostranjenost giardioze među ljudima 1.25 %-37.7 % (Tungtrongchitr i sur., 2010).

2.5.ŠKOLJKAŠI

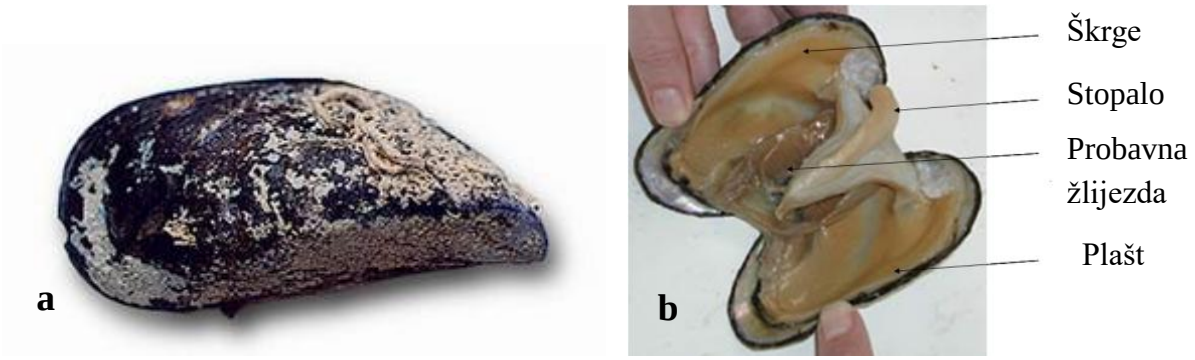
Školjkaši pripadaju razredu mekušaca (*Bivalvia*), koji su prilagođeni sesilnom ili polusesilnom načinu života, a vezani su uz morska ili slatkovodna područja (Bouchet i sur., 2010). Sadrže dvodijelnu ljusku, odnosno školjku koja je bilateralno simetrična na tijelo školjkaša i potpuno ga okružuje. Stopalo služi ukopavanju, a može varirati u veličini. Imaju otvoren optjecajni sustav i uglavnom su razdvojenog spola. Tijelo prikuplja hranu filtracijom vode na način da voda ulazi u plaštanu šupljinu, struji preko škrga i time dobavlja hranjive čestice, a odvodi ugljikov dioksid. Zadržane hranjive tvari probavljaju se ekstracelularno ili intracelularno, a postoji i mehanizam izbacivanja pseudofecesa (Habdija i sur., 2011). Ovisno o vrsti, mogu živjeti ukopani u sedimentu, pričvršćeni na različite podloge ili slobodno na morskom dnu (Matoničkin i sur., 1998).

2.5.1. Dagnja

Dagnja, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), školjkaš je primarno mediteranskog područja, ali je prisutna na svjetskoj razini zahvaljujući kultivaciji te lakom širenju i kompetitivnom ponašanju u odnosu na neke druge autohtone školjkaše. Karakterizira ju prepoznatljiva školjka (Slika 2a) čija boja varira od crne s plavim ili ljubičastim nijansama

do tamnosmeđe, a iznimno i svijetlosmeđe (CABI, 2011). Prosječna dužina školjke je 5 cm (DAFF, 2012). Anatomiju dagnje prikazuje Slika 2b.

Uglavnom se nalazi na umjereno zaklonjenim i izloženim stjenovitim obalama, dok se ne nalazi na jako muljevitim i pjeskovitim područjima. Također dobro raste i na užadi. Za podlogu čvrsto prianja zahvaljujući bisusnim nitima koje izlučuje pokretno stopalo (DAFF, 2012).



Slika 2. Školjka (a) (FAO, 2016a) i anatomija (b) (prema Craft i sur., 2010) dagnje

Hrani se filtriranjem, na način da pumpa vodu kroz velike sitaste škrge. Pritom čestice hrane zaostaju na škržnim lamelama, odakle se cilijama transportiraju prema ustima, za vrijeme čega se konstantno sortiraju prema veličini (DAFF, 2012). Odvojenog je spola, muške gonade su mliječne, a ženske ružičaste boje. Oplođena jajašca razvijaju se u slobodno-plivajuću ličinku koja brzo raste (Miza, 2016).

Dagnje su cijenjene u prehrani ljudi zbog toga što sadrže visokokvalitetne proteine i konzumentima prihvaćene senzorske osobine. Zbog povećanog iskorištavanja prirodnih resursa, sve je češći njihov uzgoj. Za potrebe prehrambene industrije, najgušće se naseljavaju priobalna područja ušća, a uzgoj se vrši na vertikalnim linijama, takozvanim pergolarima, i u košarama. Ukoliko je riječ o izlovljavanju dagnji s morskog dna, upotrebljavaju se posebni alati koji se vuku po morskom dnu ili se to obavlja ronjenjem (Džafić i sur., 2012).

2.5.2. Kamenica

Kamenica, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), komercijalni je morski školjkaš rasprostranjen u Atlantiku, Sredozemnom i Crnom moru (Carlucci i sur., 2010). Ima ovalnu, kruškoliku školjku hrapave površine (Slika 3a). Polovice školjke, ljušture, različitog su oblika, jedna je konkavna i čvrsto prianja uz tijelo školjkaša, dok je druga plosnata s oštrijim rubovima te nalikuje na poklopac. Polovice su spojene na užem dijelu elastičnom vezom, a

iznutra su glatke, sedefaste, bijele ili plavosive s mjestimičnim tamnoplavim područjima. Zatvaranje školjke postiže se zahvaljujući središnjem aduktornom mišiću (Slika 3b). Boja varira od prljavo bijele do žućkaste, sa svijetlosmeđim ili plavkastim prugama i sastoji se od niza slojeva. Meso školjkaša može biti bež do blijede sive boje, slanog do blagog okusa i nježne do čvrste teksture. Kamenica može doseći veličinu veću od 20 cm (FAO, 2016b).



Slika 3. a) školjka kamenice (Anonymous, 2012); b) anatomija kamenice: g–gonade smještene preko probavne žlijezde, gl–škrge, am–aduktorni mišić, ic–inhalatorna komora plaštene šupljine (Helm i Bourne, 2004)

Poput ostalih školjkaša, hrani se filtriranjem hranjivih tvari iz morske vode. Odrasle jedinke za hranu koriste mikroalge, detritus, zooplankton, bakterije, praživotinje i razne organske i anorganske čestice, dok se ličinke hrane raspršenim organskim tvarima (Pećarević i Bratoš, 2004).

Kamenica je protandrični hermafrodit koji spol mijenja dvaput tijekom jedne reproduktivne sezone. Na početku mriještenja ponaša se kao muška jedinka, a da bi se potom promijenila u žensku jedinku. Nakon oplodnje i perioda inkubacije od osam do deset dana, larva se ispušta u okoliš gdje provodi jednak period u pelagičnom stadiju, nakon čega naseljava podlogu. Nastanjuje čvrsto tlo u plitkim priobalnim vodama do dubine od 20 m. Može se naći i u estuarijima, na muljevito-pješčanom te stjenovitom tlu (Lapègue i sur., 2007).

Dugotrajni izlov prirodnih populacija kamenica doveo je do deficita, što je za posljedicu imalo pojačani uzgoj (Carlucci i sur., 2010), koji se vrši sistemom stalnih ili pomičnih parkova, s obješenim ili rastegnutim konopima. Mlađ se prikuplja različitim postupcima iz prirode, zatim se kamenice cementiraju na način specifičan za naše područje, a cijeli proces traje oko 30 mjeseci (Mašić, 2004).

2.5.3. Stavljanje školjkaša na tržište

Školjkaši su oduvijek zauzimali važno mjesto u prehrani ljudi, što potvrđuju mnogobrojni ostaci i otkrića školjki i ribolovnog alata još iz kamenog doba. Prvi zapisi o izlovu školjaka u Hrvatskoj potječu iz 16. stoljeća, a o uzgoju iz 17. stoljeća i vežu se za Malostonski zaljev. Do većeg uzgoja dolazi sredinom 20. stoljeća. Kod nas najveće značenje u uzgoju i prometu imaju kamenica i dagnja, dok je prstace zakonom zabranjeno izlovljavati i stavljati u promet (Mašić, 2004).

Usklađivanje zakonskih propisa Republike Hrvatske s propisima Europske unije dovelo je do promjena i u školjkarskoj industriji. Da bi se školjkaši mogli staviti na domaće ili međunarodno tržište, važno je provoditi propisane procedure te zahtjeve vezane za potrebnu infrastrukturu (Jug-Dujaković i sur., 2011). Živi se školjkaši smiju staviti na tržište u svrhu maloprodaje samo preko otpremnog centra gdje se moraju označiti identifikacijskom oznakom i to ukoliko su izlovljeni na područjima koja imaju utvrđenu lokaciju i granice te su svrstana u razrede A, B ili C (Tablica 3). Školjkaši iz razreda A smiju izravno ići na tržište za prehranu ljudi, oni iz razreda B prethodno moraju proći proces purifikacije ili kratkotrajnog ponovnog polaganja, dok školjkaši iz razreda C ne smiju ići na tržište dok ne budu na duže vrijeme ponovno položene u skladu s odredbama, kako bi se uklonila kontaminacija (Pravilnik, 2007).

Tablica 3. Podjela uzgojnih područja prema maksimalnoj dopuštenoj količini mikroorganizama (prema Pećarević i Bratoš, 2004)

Uzgojno područje	Fekalni koliformi	*E.coli*	*Salmonella* vrste
A	< 300/100 g tkiva	< 230/100 g tkiva	0/25 g tkiva
B	< 6000/100 g tkiva	< 4600/100 g tkiva	
C	< 60000/100 g tkiva		

Pročišćavanje (depuracija ili purifikacija) je proces kojim se živi školjkaši sakupljeni za tržište stavljaju u pogone gdje se sadržaj njihova probavnog sustava pročišćava čistom morskom vodom u kontroliranim uvjetima. Otpremni centri mogu biti smješteni na kopnu ili na plovilima, a imaju važnu ulogu u osiguravanju zdravstvene ispravnosti i sigurnosti školjkaša namijenjenih prehrani, s obzirom da do njihove kontaminacije može doći tijekom uzgoja, sakupljanja ili izlovljavanja te dopremanja u otpremni centar. Stoga i za purifikacijske

i otpremne centre, kao i u drugim granama prehrambene industrije, vrijede minimalni zahtjevi kojima moraju udovoljiti da bi se školjkaši plasirali na tržište (Jug-Dujaković i sur., 2011).

U Hrvatskoj se uzgoj kamenica najvećim dijelom odvija na području Malostonskog zaljeva i Malog mora, dok se dagnje najviše uzgajaju na području zapadne obale Istre, ušća rijeke Krke i Novigradskog mora. Podaci za 2013. godinu pokazuju kako je u Hrvatskoj proizvedeno 1 950 tona dagnji i 50 tona kamenica (Ministarstvo poljoprivrede, 2015). Ukupna svjetska proizvodnja dagnji iste je godine iznosila 1 768 129 tona, a kamenica 4 951 880 tona (FAOSTAT, 2014).

2.5.4. Bolesti koje prenose školjkaši

Kontaminacija školjkaša događa se prvenstveno zbog načina njihove prehrane pri čemu filtriraju vodu koja često sadrži viruse i bakterije, koji su najčešći kontaminanti školjkaša. Rizik od obolijevanja ili čak smrtnih posljedica svojstven je svim potrošačima, no iznimno je povećan kod onih s već utvrđenim zdravstvenim poremećajima te osobama koje konzumiraju sirove školjkaše. Ukoliko se školjkaši uzgajaju u zagađenim vodama, može doći do kemijske kontaminacije teškim metalima, pesticidima i ostacima lijekova. Ozbiljnu prijetnju zdravlju predstavljaju biotoksini, koje proizvode dinoflagelati i domoična kiselina, uzrokuju brojne vrste trovanja, poput paralitičkog i neurotoksičnog. Primjeri bakterija povezanih s bolestima koje prenose školjkaši su vrste iz rodova *Salmonella* i *Shigella*, *E.coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* i neke vrste roda *Vibrio*. Virusni uzročnici bolesti su norovirusi, hepatitis A virus, enterovirusi i adenovirusi. Veliku pozornost izazivaju i protozoe koje često parazitiraju školjkaše, a to su *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* i *Toxoplasma gondii* (Oliveira i sur., 2011).

Pojava bolesti školjkaša jednako je prisutna i u akvakulturi, no ovdje je prisutna mogućnost pravovremenog reagiranja, koja ovisi o sposobnostima i trudu samih uzgajivača. Učestalost se može smanjiti ukoliko se izbjegavaju stresni uvjeti koji bi rezultirali smanjenjem otpornosti uzgajanih organizama. Stoga je potrebno kontrolirati kvalitetu vode, smanjiti manipulaciju školjkašima, odrediti pravilnu gustoću uzgajane populacije te izolirati one jedinke za koje se sumnja da su bolesne (Čadež, 2005). Nepovoljan čimbenik u akvakulturi je naglo umnožavanje patogena unutar domadara, kao i prijenos uzročnika bolesti na druge jedinke što dovodi do epizootija koje je praktički nemoguće kontrolirati. Širenje patogena može se odvijati i tijekom inkubacije i ako se patogen ne ukloni, domaćin ostaje

prijenosnik bolesti, a sveukupnu situaciju otežava ako se ne jave simptomi bolesti (Bratoš i sur., 2003).

2.5.4.1. Školjkaši kao prijenosnici G. duodenalis

Giardia je veoma rasprostranjena u prirodi, što zbog prisutnosti divljih životinja, što zbog ljudi i poljoprivrednih aktivnosti, zbog čega često parazitira i školjkaše. Istraživanja su pokazala kako su površinske vode često kontaminirane cistama giardija, a zajedno s otpadnim vodama onečišćuju ušća i dospijevaju u morska područja (Gómez-Couso i sur., 2005; Giangaspero i sur., 2007; Robertson, 2007), čime predstavljaju prijetnju zdravstvenoj ispravnosti školjkaša.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

Dagnje i kamenice sakupljene su između 2011. i 2015. godine, u periodu od rujna do veljače u sklopu programa kontrole martelioze i bonamioze u uzgajalištima školjkaša. Nakon dostave u HVI izdvojene su probavne žlijezde te su pohranjene u eppendorfice zapremine 2 mL, na temperaturi -21 °C do provođenja pretraga. Ukupno je analizirano 635 uzoraka, od čega 313 uzoraka dagnji i 322 uzorka kamenica. Lokacije uzgajališta iz kojih su sakupljene školjke prikazane su na Slici 4.



Slika 4. Lokacije uzgajališta školjaka iz kojih su sakupljeni uzorci

3.2.METODE RADA

3.2.1. Molekularna karakterizacija

Tipizacija svih giardija provedena je izdvajanjem ukupne DNA (prema uputama proizvođača), umnažanjem specifičnog odsječka DNA (Sulaiman i sur., 2003) i određivanjem nukleotidnog slijeda pročišćenog proizvoda za svaki pojedini izolat (Macrogen Europe, Nizozemska).

3.2.1.1. Izdvajanje parazitske DNA

Parazitska DNA izdvojena je komercijalnim kitom QIAamp Blood and Tissue Kit (Quiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Ovako izdvojena DNA probavne žlijezde školjaka najpogodnija je za daljnje postupke analize.

Sastav kita (QIAamp Blood and Tissue Kit):

- QIAamp kolone za centrifugiranje 50 komada
- Plastične epruvete od 2 ml 200 komada
- Puferska otopina ASL 140 mL
- Puferska otopina AL 33 mL
- Puferska otopina AW1 (koncentrirana) 19 mL
- Puferska otopina AW2 (koncentrirana) 13 mL
- Puferska otopina AE 12 mL
- Proteinaza K 1,4 mL

Osim materijala i reagensa sadržanih u QIAamp Blood and Tissue Kit-u, za izdvajanje parazitske DNA još su korišteni:

- Etanol 100%
- Eppenforf epruvete za mikrocentrifugiranje od 1,5 mL
- Bočice s čepom na navoj od 5 mL
- Mikropipete od 10 µL, 100 µL i 1000 µL
- Odgovarajući sterilni nastavci za pipete s filterom
- Mikrocentrifuga
- Vrtložnik
- Zaštitne rukavice.

3.2.1.2.Postupak izdvajanja parazitske DNA

U plastične epruvete od 2 mL dodano je 100 µL uzorka u kojem su bile prisutne ciste gijardija i 2 mL puferske otopine ASL. Epruvete su vorteksirane tijekom 15 do 30 sekundi dok nije dobivena homogenizirana suspenzija u puferskoj otopini ASL. Nakon homogenizacije, suspendirane ciste inkubirane su na 90ºC u puferskoj otopini ASL 5 minuta. Potom je suspenzija vorteksirana 15 sekundi i centrifugirana tijekom jedne minute na 14000 okr/min kako bi se istaložile sve čestice.

U novu ependorf epruvetu pipetirano je 15 µL proteinaze K i 200 µL supernatanta te puferska otopina AL. Smjesa je vorteksirana 15 sekundi te je inkubirana 10 minuta pri temperaturi 70ºC. Po završetku inkubacije u smjesu je dodano 200 µL apsolutnog etanola, nakon čega je provedeno vorteksiranje kroz 15 sekundi.

QIAamp kolone za centrifugiranje stavljene su u plastične epruvete volumena 2 mL i u svaku kolonu dodano je 415 µL priređene suspenzije. Kolone su centrifugirane u mikrocentrifugi pri 8000 okr/min tijekom 1 minute. Ovim se postupkom na membranu kolone vezala ukupna DNA izdvojena iz uzorka, uključujući i parazitsku.

Kolone sa vezanom DNA stavljene su u novu plastičnu epruvetu, u koju je dodano 500 µL aktivirane puferske otopine AW1 te su centrifugirane pri 8000 okr/min tijekom 1 minute. Zatim su kolone prebačene u nove plastične epruvete i dodano je 500 µL aktivirane puferske otopine AW2. Uslijedilo je centrifugiranje pri 14000 okr/min tijekom 3 minute. Po završetku centrifugiranja kolone su prebačene u nove plastične epruvete te je centrifugiranje ponovljeno pri 14000 okr/min tijekom 1 minute kako bi se u cijelosti odstranila AW2 puferska otopina.

Kolone su nakon toga stavljene u nove eppendorf epruvete. Neposredno na membrane dodano je 100 µL puferske otopine AE kojom se ispire izdvojena DNA s membrane kolona. Kolone su inkubirane na sobnoj temperaturi tijekom 1 minute, nakon čega su centrifugirane pri 8000 okr/min tijekom 1 minute.

Po završetku centrifugiranja u eppendorf epruveti nalazi se izdvojena DNA koja je korištena u postupku lančane reakcije polimerazom za dokazivanje ciljanih DNA odsječaka gijardija.

3.2.1.3.Umnažanje ciljanog odsječka tpi gena lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom korištena je kako bi se umnožio ciljani odsječak trioza fosfat izomeraza gena od 550 baznih parova (engl. base pairs, bp). Ovaj gen je odabran zbog postojanja dovoljnog broja razlika u nukleotidnom slijedu što omogućava utvrđivanje genske raznolikosti unutar vrste *G. duodenalis*.

Ciljani odsječak DNA je umnožen upotrebom dva para početnica prema Sulaimanu i sur. (2003) ugniježđenim PCR protokolom. Za umnažanje većeg odsječka od 605 bp u prvoj PCR reakciji upotrijebljena je prednja početnica 5'AAATTATGCCTGCTCGTCG-3' (AL3543) i stražnja početnica 5'-CAAACCTTTTCCGCAAACC -3' (AL3546).

Kao predložak za drugu PCR reakciju upotrijebljen je PCR proizvod iz prve reakcije korištenjem prednje početnice 5'- CCCTTCATCGGTGGTAACTT-3' (AL3544) i stražnju početnicu 5'-GTGGCCACCACTCCCGTGCC-3' (AL3545). U prvoj reakciji korišteno je 2 mL izdvojene DNA, a u drugoj reakciji 5 mL PCR proizvoda iz prve reakcije. Očekivana veličina umnoženog proizvoda *tpi* gena protozoona *G. duodenalis* je 530 bp (Tablica 4).

Tablica 4. Početnice korištene u prvom PCR-u i u ugniježđenoj reakciji

Ime početnice	Smjer vezanja početnice	Redoslijed nukleotida u početnici	Mjesto vezanja početnice	Veličina odsječka
AL3543	Prednja	AAATTATGCCTGCTCGTCG	538-556	605
AL3546	Stražnja	CAAACCTTTTCCGCAAACC	1129-1147	
AL3544	Prednja	CCCTTCATCGGTGGTAACTT	558-577	530
AL3545	Stražnja	GTGGCCACCACTCCCGTGCC	1068-1087	

Lančana reakcija polimerazom provodila se u zasebnoj prostoriji, prilikom čega je korišten pribor slobodan od DNA/RNA, zaštitna odjeća te rukavice. Također je korištena voda slobodna od enzima RNaza i DNaza, zaseban set mikropipeta od 10 µL, 100 µL i 1000 µL s odgovarajućim nastavcima s filterom i epruvetice za PCR od 0,2 mL slobodne od DNaze. Mješavina svih reagensa (engl. Master mix) potrebnih za umnožavanje dobivenog proizvoda PCR metodom pripremljena je u sterilnim eppendorf epruvetama.

Korištene su sljedeće količine reagensa istog proizvođača (Promega, Madison, WI, SAD):

Reagens	Količina za I reakciju	Količina za II reakciju
Voda slobodna od RNaza i DNaza	29,5μL	26,5 μL
Green Flexi reakcijski pufer (5X)	10 μL	10 μL
25 mM $MgCl_2$	3 μL	3 μL
dNTP Mix (200 μL)	1 μL	1 μL
Prednje specifične početnice (10 pmol)	1 μL	1 μL
Stražnje specifične početnice (10 pmol)	1 μL	1 μL
GOtaq Flexi DNA Polymerase (5 U/μL)	0,25 μL	0,25 μL
DNA predložak	2 μL	5μL

Sadržaj je dobro promiješan pipetiranjem i razdijeljen u svaku PCR epruveticu u količini od 48 μL za prvu reakciju. Potom je u svaku PCR epruveticu uneseno 2 μL uzorka izdvojene DNA ispitivanih uzoraka, odnosno jednaka količina vode za negativnu kontrolu. U posljednu epruveticu unesena je referentno pozitivna DNA kontrola. Prije izvođenja PCR-a početnice su razrijeđene s vodom slobodnom od RNaza i DNaza tako da je radna koncentracija početnica bila 10 pmol/mL.

PCR epruvetice su stavljene u T-personnel tolokružnik (aparat za termocikliranje ili engl. termocycler, proizvođač Whatman-Biometra, Goettingen, Njemačka) koji je prethodno bio zagrijan pri 92ºC. Uključen je program 1 za umnažanje vanjskog odsječka *tpi* gena veličine 605 bp. Reakcija se sastojala od inicijalne 2 minute denaturacije, nakon koje je slijedilo 35 ciklusa kako slijedi:

denaturacija na 94ºC kroz 45 s;

prihvaćanje početnica na 50ºC kroz 45 s

produženje reakcije na 72ºC kroz 60 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje reakcije provedeno je na 72ºC tijekom 7 min. Reakcija je automatski zaustavljena na temperaturi od 4ºC.

Za drugu, ugniježđenu reakciju korišteno je 45 μL mješavine i 5 μL PCR proizvoda iz prve reakcije koji je služio kao predložak za drugu PCR reakciju. Mješavina je pripremljena na isti način kao i u prvoj reakciji samo su korištene početnice AL3544 i AL3545 te smanjena

količina vode kako je prethodno prikazano. Za sigurnost i kontrolu moguće kontaminacije korištene su dvije negativne kontrole i jedna pozitivna. Prva negativna kontrola je predstavljala 5 µL predloška negativne kontrole iz prve reakcije, dok je druga predstavljala 5 µl vode. Za pozitivnu kontrolu korišteno je 5µL pozitivne kontrole iz prve reakcije. Reakcija se sastojala od inicijalne 2 minute denaturacije, nakon čega je uslijedilo 35 ciklusa:

denaturacija na 94ºC kroz 45 s;

prihvaćanje početnica na 50ºC kroz 45 s

produženje reakcije na 72ºC kroz 60 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje reakcije provedeno je na 72ºC tijekom 7 min. Reakcija je automatski zaustavljena na temperaturi od 4ºC.

PCR metodom iz izdvojene DNA umnožen je odsječak *tpi* gena koji je korišten za određivanje nukleotidnog slijeda, a uspješnost umnožavanja provjerena je kapilarnom elektroforezom.

3.2.1.4. Kapilarna elektroforeza

Produkti umnožavanja analizirani su kapilarnom elektroforezom u sustavu QIAxcel System (QIAGEN, Hilden, Njemačka) s markerom veličine 100 – 3000 bp (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača.

3.2.1.5.Pročišćavanje proizvoda PCR-a

Prije određivanja nukleotidnog slijeda, nužno je provesti pročišćavanje proizvoda PCR reakcije. U tu svrhu korišten je ExoSAP-IT – PCR Clean-Up Reagent (USB Corporation, Cleveland, SAD) prema uputama proizvođača.

3.2.1.6.Određivanje nukleotidnog slijeda odsječka tpi gena

Nukleotidni sljedovi DNA određivani su u svrhu genskog razlikovanja *G. duodenalis*. Određivanje nukleotidnog slijeda provedeno je u Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska) u oba smjera s istim početnicama korištenim za PCR, pomoću ABI PRISM BigDye Terminator sustava, GeneAmp PCR 2400 (PE Biosystems, SAD).

Korištena je prednja početnica 5'-CCCTTCATCGGTGGTAACTT-3' (AL3544) i stražnja početnica 5'- GTGGCCACCACTCCCGTGCC-3' (AL3545) u koncentraciji od 10 μL/mL.

3.2.1.7. Analiza slijeda nukleotida odsječka tpi gena

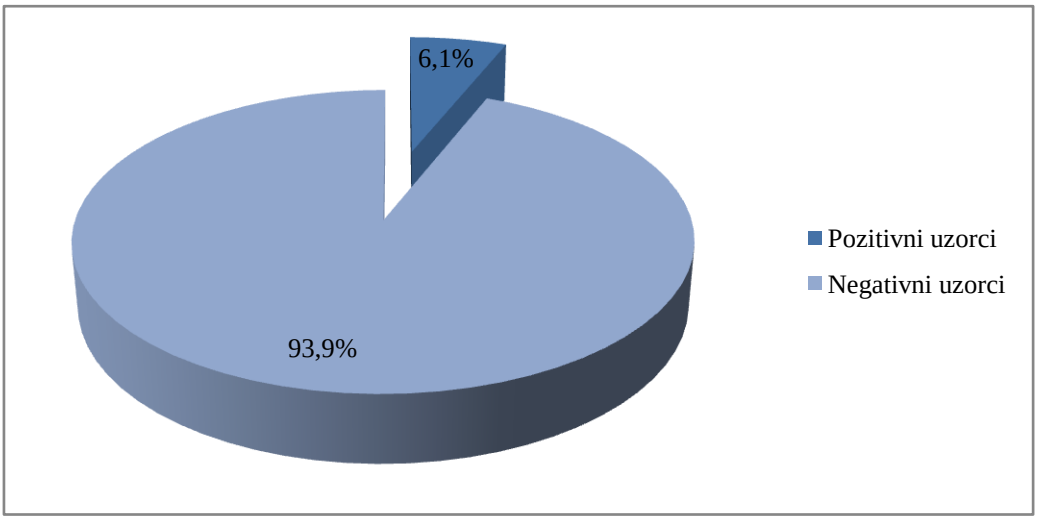
Rezultati određivanja nukleotidnih sljedova obrađeni su s pomoću računalnog programa Lasergene® (DNASTAR inc., Madison, Winsconsin, SAD) s pripadajućim potprogramima SeqMan™ i EditSeq™. Dobiveni nukleotidni sljedovi poravnani su računalnim potprogramom SeqManTM i uspoređeni s nukleotidnim sljedovima bičaša *Giardia duodenalis* pohranjenima u banci gena GenBank. Banka gena pretražena je pomoću programa Basic Local Aligment Search Tool, BLAST®.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Giardia duodenalis protozoa je koja predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Uzročnik se prenosi hranom i vodom te pripada skupini visokorizičnih bolesti prenosivih vodom. Zoonotske genske skupine se razlikuju od vrsno specifičnih po invazivnosti za različite domaćine uključujući ljude i različite vrste životinja. Kako se uzročnik prenosi vodom tako i vodeni organizmi mogu unijeti ciste.

Jedna od skupina životinja koje filtriraju znatne količine vode su školjke koje predstavljaju izvrsnu indikatorsku skupinu kojom se može pratiti onečišćenje s kopna. Ujedno se koriste i za hranu stoga mogu predstavljati izvore invazije i za ljude. Poznate su infekcije ljudi nakon konzumiranja svježih, termički neobrađenih školjaka bakterijama (*E. coli, Salmonella* sp.) i virusima (npr. norovirusi). Za razliku od njih, rijetko ili gotovo nikad se ne određuje prisutnost protozoa prenosivih vodom poput giardija i kriptosporidija bez obzira na njihovu prilagođenost vodenom mediju. Ove vrste mogu preživjeti u slanoj vodi nekoliko tjedana pa mogu predstavljati neposredan izvor invazije za ljude.

Kako ne postoje istraživanja niti podaci o giardijama u školjkašima iz uzgajališta Republike Hrvatske, provedeno je istraživanje školjaka ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Ujedno, zbog složenosti najnovije podjele bičaša *Giardia duodenalis*, bilo je potrebno provesti i neposredno određivanje nukleotidnih sljedova umnoženih odsječaka triofosfat izomeraza gena, kako bi se odredile genske skupine, a time i podrijetlo prisutnih giardija.



Slika 5. Udjel školjaka pozitivnih na *G. duodenalis*

U ispitivanim uzorcima, *G. duodenalis* je dokazana u 6,1 % uzoraka, što prikazuje Slika 5. Pritom je udjel dagnji pozitivnih na giardije iznosio 5,1 %, a kamenica 7,1 %. Razlog češćoj kontaminaciji kamenica možda je taj što su u ukupnom broju ispitivanih uzoraka kamenice bile malo zastupljenije, ali dodatni čimbenik koji bi mogao tako djelovati je vrijeme trajanja uzgoja školjkaša. Kod nas se dagnje u prosjeku uzgajaju 20 mjeseci, dok uzgoj kamenica traje 30 mjeseci (Mašić, 2004).

Svaka od uzgajališnih lokacija uključenih u istraživanje sadržavala je školjkaše pozitivne na ciste giardija. Time je potvrđena prisutnost invadiranih školjaka u uzgajalištima Jadranskog mora te njihova opasnost po ljudsko zdravlje, posebno što se tiče kamenica koje se u pravilu konzumiraju žive.

Udjel pozitivnih školjkaša iz ovog istraživanja teško je usporediti s drugim vrijednostima već provedenih istraživanja iz par razloga. Iako je teoretska opasnost od školjkaša zaraženih cistama giardija velika, ispitivanje njihove prisutnosti je rijetko u odnosu na primjerice kriptosporidije, što se vidi iz prikaza dosadašnjih istraživanja (Willis i sur., 2013). Također, prisutna je velika varijabilnost u rezultatima, ovisno o ispitivanim školjkama i područjima gdje su se ispitivanja provodila. Školjke nekih lokacija, poput zaljeva Chesapeake (SAD), bile su negativne na prisutnost giardija, dok su se izmjerene vrijednosti na lokacijama s pozitivnim školjkašima kretale primjerice od 3,4 % u estuarijima Oostercshelde (Nizozemska), preko 18 % u Nunaviku (Kanada) do čak 41,8 % u galicijskoj obali (Španjolska). Iz toga se može zaključiti kako su uzgajališta školjaka u Republici Hrvatskoj u kategoriji područja slabije kontaminiranih cistama giardija (Willis i sur., 2013).

Tablica 5. Rezultati istraživanja za dagnje (*Mytilus galloprovincialis*)

Lokacija	Pozitivno	Negativno	Učestalost (%)	Genska skupina
Vabriga	1	34	2,9	B
Raški zaljev	2	33	5,7	C
Medulinski zaljev	1	28	3,4	AI
Uvala Dinjiška, Pag	1	26	3,7	E
Marinski zaljev	2	32	5,9	C
Uvala Maslinova, Brač	3	30	9,1	B
Bistrina, Malostonski zaljev	2	30	6,3	AI
Bjejevica, Malostonski zaljev	1	31	3,1	AI
Mali Ston, Malostonski zaljev	1	26	3,7	AI
Sutvid, Malostonski zaljev	2	27	6,9	AI

Rezultati istraživanja u Tablici 5 prikazuju učestalost invadiranih dagnji koja je bila najmanja u uzgajalištu Vabriga, a najveća u uvali Maslinova na Braču.

Pritom se može uočiti kako su ispitivane dagnje s područja Istre pokazale malu učestalost cista giardija, osim u slučaju onih podrijetlom iz Raškog zaljeva. Razlog tome jest što je ta zona smještena u uskom, zaklonjenom zaljevu, u koji se slijeva rijeka Raša, čiji tok može donijeti brojne kontaminante, a tako i parazite s udaljenih kopnenih područja u more. Time se potvrđuje povećana mogućnost kontaminacije školjaka uzgajanih u predjelima mora gdje se nalaze i ušća rijeka. Iako se slična pretpostavka može donijeti i u slučaju zone Vabriga u čijoj se blizini nalazi ušće rijeke Mirne, zabilježeni rezultati su pokazali upravo suprotno u ovom slučaju. Iz toga se može zaključiti kako morske struje učinkovito odvode potencijalne tvari i organizme kojima bi rijeka mogla zagaditi more, a ujedno i kontaminirati školjkaše. Područje Medulinskog zaljeva također je pokazalo nisku učestalost, vjerojatno zbog geografskog obilježja samog zaljeva, koji je više u doticaju s otvorenim morem. Također, tome doprinose i morske struje od kojih zimi, kada su uglavnom uzorci sakupljani, prevladavaju pogodne sjeverozapadne ulazne struje (Lipovšćak i Lakoš, 2014).

Uvala Dinjiška na Pagu poznata je po uzgoju dagnji. Pokazala je manju vrijednost učestalosti školjaka pozitivnih na giardije, unatoč tome što se nalazi na južnom zaklonjenom dijelu otoka.

Za razliku od nje, školjke iz Marinskog zaljeva bile su češće invadirane, a uzrok se može naći u tome što je područje uzgajališta u dodiru s velikim brojem vrulja, putem kojih je prisutan cjelogodišnji dotok slatke vode koji smanjuje salinitet mora (Plan praćenja, 2009).

Uvala Maslinova imala je najveću učestalost giardija u dagnjama. Uzročnik je taj što je uvala preopterećena, kako uzgajalištima školjaka tako i ribogojilištima, što smanjuje kvalitetu uzgoja i uzrokuje stres školjkašima (Šerić, 2007). Nadalje, uvala se nalazi u blizini turističkog mjesta Milna, zbog čega je na rezultat potencijalno djelovao i ljudski čimbenik.

Malostonski zaljev podijeljen je u mnogo zona za uzgoj školjkaša i u slučaju ispitivanih dagnji pokazao je variranje u stupnju invadiranosti školjaka ovisno o lokaciji. U zaljev se ulijeva rijeka Neretva, na južnom se dijelu zaljev sve više sužava, a dubina mora se smanjuje i to utječe na manje cirkulacije morske vode zbog čega školjkaši imaju veći preduvjet za filtriranjem nečistoća, a ujedno i cista giardija. Stoga rezultati za primjerice zonu Mali Ston odstupaju od očekivanih, a mogući razlog tome je povoljan salinitet morske vode.

Tablica 6. Rezultati istraživanja za kamenice (*Ostrea edulis*)

Lokacija	Pozitivno	Negativno	Učestalost (%)	Genska skupina
Savudrijska vala	1	30	3,2	B
Vabriga	1	28	3,4	B
Uvala Budava, Pula	2	29	6,5	C
Medulinski zaljev	3	33	8,3	AI
Uvala Stara Povljana, Pag	2	29	6,5	E
Lukar projekt, Pag	2	27	6,9	E
Bistrina, Malostonski zaljev	4	34	10,5	AI
Brijesta, Malostonski zaljev	3	31	8,8	AI
Mali Ston,Malostonski zaljev	2	26	7,1	AI
Sutvid, Malostonski zaljev	3	32	8,6	AI

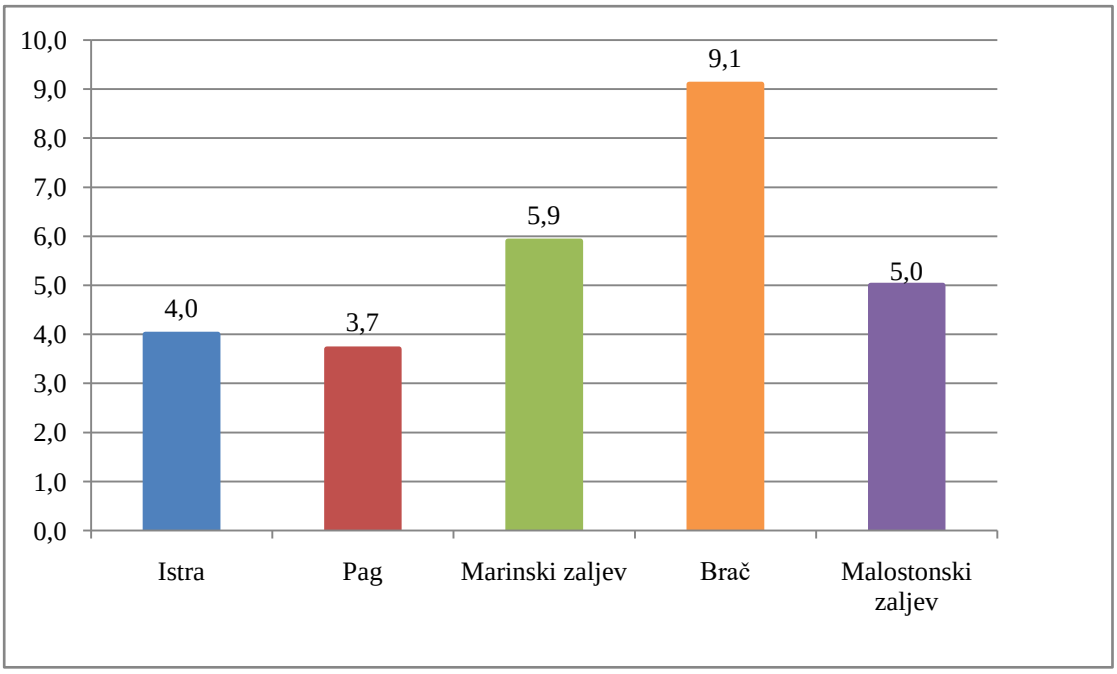
Tablica 6 prikazuje rezultate istraživanja za kamenice, u slučaju kojih je najmanja učestalost na području Savudrijske vale, dok je najveća vrijednost zabilježena za zonu Bistrina u Malostonskom zaljevu.

Rezultati za kamenice iz uzgajališnih područja na sjeverozapadnoj obali Istre (Savudrijska vala i Vabriga) pokazali su znatno manju učestalost od onih s južnog dijela Istre (uvala Budava i Medulinski zaljev). Posebno je zanimljivo usporediti Medulinski zaljev gdje su kamenice jako invadirane u odnosu na dagnje iz iste uzgajališne lokacije. Pritom se ne može sa sigurnošću povući paralela između vrsta školjaka zbog razlike u broju ispitanih uzoraka obje vrste s ove lokacije. Za uvalu Budava rezultati su u očekivanom rasponu s obzirom da je to jedino od ispitanih uzgajališta u neposrednoj blizini velikog naselja.

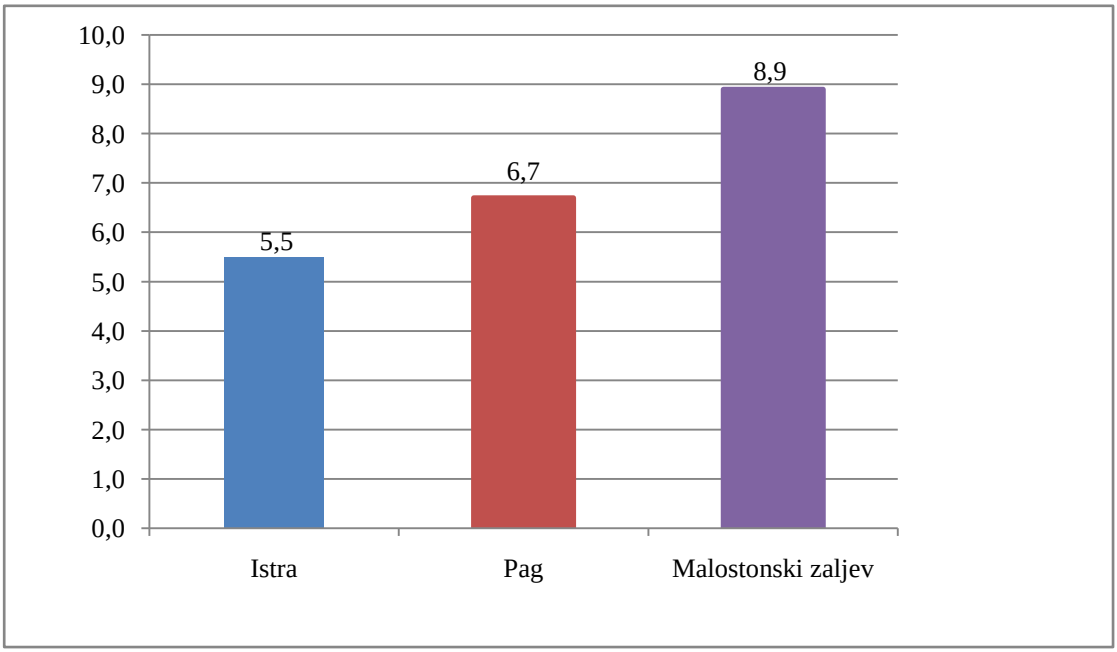
Uvala Stara Povljana ima dugu tradiciju uzgoja školjaka, dok je uzgajalište u sklopu Lukar projekta aktivno zadnjih godina i nalazi se u predjelu Maunskog kanala. Oba su uzgajališta smještena na zapadnoj strani otoka Paga. Shodno tome, učestalost giardija u školjkama je približno jednaka za ta dva područja i vrijednostima pripadaju u srednje učestalo invadirana područja.

Prvi podaci o uzgoju kamenica u Hrvatskoj vezani su za Malostonski zaljev, u kojem je i danas velik broj uzgajivača (Mašić, 2004). Rezultati ovog istraživanja pokazuju visoku učestalost kontaminiranih kamenica u svim zonama Malostonskog zaljeva, što je u skladu s očekivanjima zbog uvjeta uzgoja spomenutih ranije u slučaju dagnji. Ujedno je na tom području, u zoni Bistrina zabilježena najveća učestalost od svih ispitivanih uzoraka i iznosila je 10,5 %. S obzirom na brojne uzgajivače kamenica, ovi su rezultati od iznimne važnosti jer mogu upućivati na ljudski faktor i određen stupanj nedovoljne higijene u uzgojnom procesu.

Općenito se može donijeti zaključak kako su geografski bliska područja koja međusobno pokazuju male razlike u učestalosti vjerojatno pod utjecajem istog izvora kontaminacije cistama.



Slika 6. Učestalost (%) giardija u dagnjama po uzgajališnim područjima



Slika 7. Učestalost (%) giardija u kamenicama po uzgajališnim područjima

Slika 6 prikazuje rezultate analize dagnji po grupiranim područjima iz čega je vidljivo kako su manje invadirane dagnje podrijetlom iz sjevernih uzgajališta. Daleko najveću učestalost pokazuje uzgajalište Uvala Maslinova, no nedostatak takve usporedbe je taj što se u ovom konkretnom slučaju otok Brač, kao i Marinski zaljev ne mogu jednako ravnopravno uspoređivati s ostalim grupiranim područjima koja obuhvaćaju više lokacija.

Slika 7 služi kako bi isti prikaz dala i za kamenice. Iz nje se vidi kako su u Malostonskom zaljevu najučestalije zaražene kamenice. Područje Istre pokazalo je najmanju učestalost. Može se reći kako vrijednosti jednoliko rastu prema južnim lokacijama.

Usporedbom slika 6 i 7, stvara se uvid u cjelokupan uzgajališni karakter dagnji i kamenica u Jadranskom moru. Rezultati se podudaraju za područje Istre, a također im je zajednički i porast učestalosti za Malostonski zaljev, iako je sama vrijednost za kamenice drastično veća. Razlika se primjećuje za paško područje. Dok je kod dagnji zabilježena najmanja prosječna vrijednost za dano područje, kod kamenica je ona puno veća i po vrijednostima se nalazi između Istre i Malostonskog zaljeva. Na temelju toga što uzorci dagnji i kamenica nisu sakupljeni iz istih uzgajališta na otoku Pagu, ne može se zaključiti je li to posljedica svojstava pojedine vrste školjke ili okolišnih uvjeta.

Svakako se može reći da su dobivene vrijednosti učestalosti varijable uzgajališnog područja i vrste školjaka.

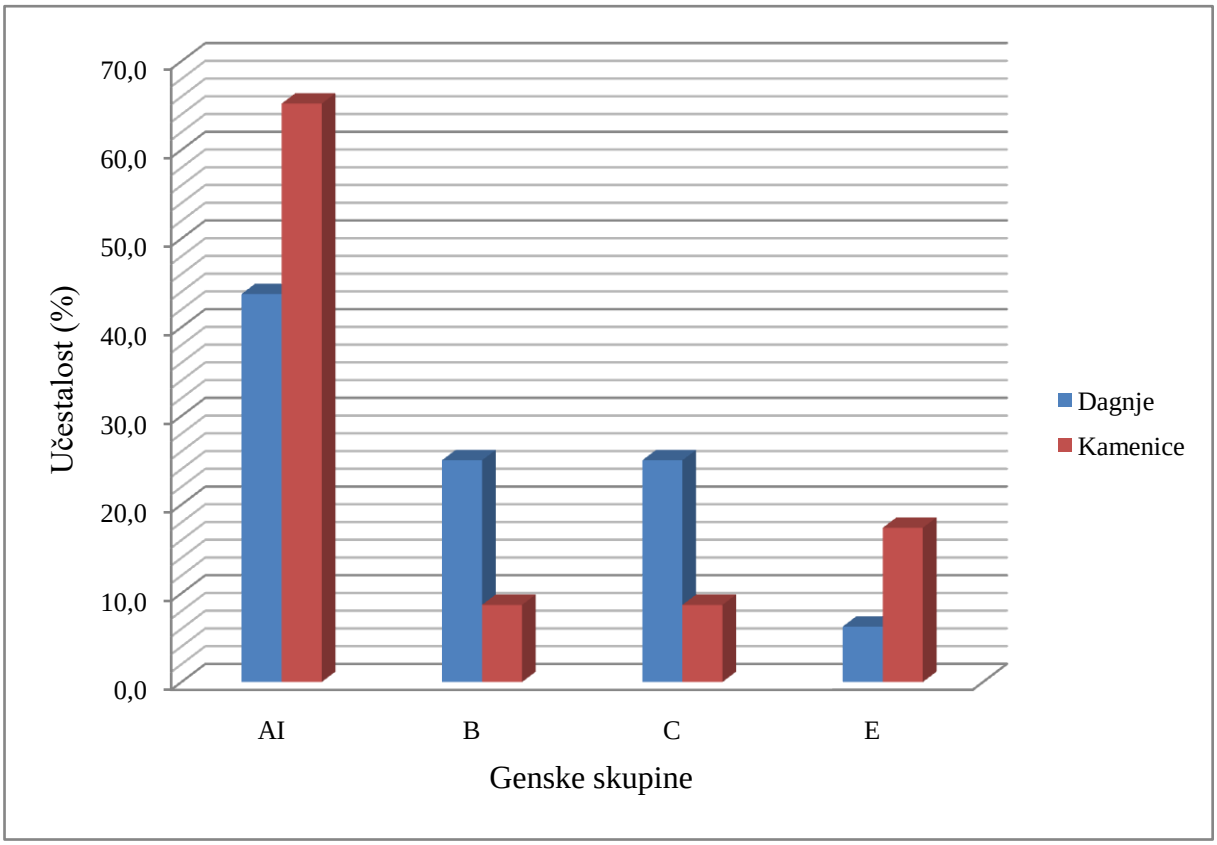
Istraživanje (Gómez-Couso i sur., 2004) prisutnosti giardija metodom ugniježđene lančane reakcije polimerazom pokazalo je začuđujuću razliku ovisno o podrijetlu ispitivanih školjaka. Svi uzorci školjkaša iz Ujedinjenog kraljevstva bili su negativni. Nasuprot tome, 11,1 % španjolskih kamenica sadržavalo je giardije. Iako je *G. duodenalis* čest parazit površinskih voda te je njihova koncentracija veća nego oocista kriptosporidija, kao objašnjenje je navedeno kako ciste giardija nisu u tolikoj mjeri sposobne preživjeti aktivnost probavnih enzima u školjkama domaćinima.

Ispitivanje prisutnosti giardija i kriptosporidija u komercijalnim kamenicama podrijetlom iz uzgajališne zone Yerseke, Nizozemska, provodilo se na uzorcima sakupljenim tokom cijele godine i pokazalo se kako su pozitivne kamenice uglavnom bile one sakupljene tokom toplijih mjeseci (Schets i sur., 2007). Tako postoji mogućnost povećane učestalosti pozitivnih dagnji i kamenica i iz ovdje ispitivanih područja tokom ljetnih mjeseci.

Razmatrajući dobivene rezultate, potvrđene su dosadašnje pretpostavke kako kvalitetan uzgoj školjkaša varira ovisno o svojstvima uzgajališnog područja, koje direktno utječe i na vjerojatnost moguće kontaminacije. Proizvodnja školjkaša ovisi o dostupnosti čestica nutrijenata zbog čega su idealna priobalna područja. Međutim, unatoč geomorfološkim značajkama poput zatvorenosti uvale, zaljeva ili lagune te plitkoće dna koji povećavaju produktivnost uzgojnog područja, ukoliko su ta područja primjerice pod utjecajem eutrofikacije, cvjetanja mora i potrošnje kisika, vidljiv je nepovoljan utjecaj na kvalitetu mora i marikulturu. Lokacije smještene između kopna i otvorenog mora, često su izložene urbanim, industrijskim ili turističkim utjecajima te prekomjerno iskorištenim slivovima (Francavilla i sur., 2012).

Literaturni podaci navode kako utjecaj na koncentraciju cista u okolišu imaju razni kemijski i fizikalni čimbenici. Pritom su temperatura i salinitet morske vode u korelaciji i smatraju se kritičnim čimbenicima. Za razliku od njih, koncentracija amonijaka, pH i UV zračenje nemaju nužno uvijek utjecaj na ciste, no zabilježena je njihovo sinergističko djelovanje. Dakako, treba uzeti u obzir i činjenicu da se školjkaši uzgajaju u vodi dubine 50 cm do 2 m, čim se lako postigne potenciran učinak prisutnih okolišnih uvjeta (Francavilla i sur., 2012; Giangaspero i sur., 2009).

Na zaključke kako navedeni čimbenici podosta utječu na razlike u kontaminiranosti uzgajanih školjaka ovisno o lokaciji upućuje i ispitivanje provedeno na mediteranskim dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*) i pacifičkim kamenicama (*Crassostrea gigas*) svjetlosnom mikroskopijom, imunofluorescencijom i PCR metodom i svi testovi dali su negativne rezultate. Donesen je zaključak kako su fizikalni i kemijski čimbenici uzgajališta nepovoljno djelovali na preživljavanje cista te da su cirkulirajuće morske struje i mijene pozitivno djelovale na čistoću morske vode (Tedde i sur., 2013).



Slika 8. Usporedba učestalosti dokazanih genskih skupina po vrstama školjaka

Unutar vrste *Giardia duodenalis*, prepoznato je osam različitih genskih skupina. Od toga su u ovome istraživanju potvrđene četiri genske skupine pronađene u dagnjama i kamenicama u uzgajalištima Republike Hrvatske. To su skupine A s pripadajućom podskupinom I te skupine B, C i E. Ti rezultati pokazuju dvojaku važnost. S obzirom da skupine A i B, uz brojne druge sisavce, invadiraju i čovjeka, ovime je potvrđeni antropo-zoonotski potencijal giardija iz ispitivanih školjkaša. Nadalje, skupine C i E povezane su s domaćinima koji su prisutni u svakodnevnom životu ljudi. Time se povećava njihov potencijal za prijenosom giardija, ali i drugih parazita ili bakterija, u vodeni okoliš, a posljedično i školjkaše.

Prikaz usporedbe utvrđenih genskih skupina po vrstama ispitivanih školjaka, dan je na Slici 8. Tako je i kod dagnji i kamenica zabilježena najčešće genska skupina AI. Ovisno o školjkašu, prisutne su znatne razlike. Za kamenice je vrijednost učestalosti skupine AI veća za čak 21,4 % u odnosu na dagnje. Sveukupno, za obje vrste školjaka može se reći kako je skupina AI prevladala u rezultatima, zbog čega je i njen utjecaj na sigurnost hrane veći, imajući u vidu širok spektar domadara. Daljnjom usporedbom, dolazi se do zanimljivih rezultata koji pokazuju kako je pojava genskih skupina B i C rjeđe zabilježena, ali je njihov udjel jednak kod obje vrste školjaka. Učestalost skupina B i C veća je kod dagnji. Posljednja dokazana genska skupina je E, kod koje je prisutna razlika u cjelokupnoj tendenciji udjela određene skupine u pojedinom školjkašu. Tako je za dagnje udjel skupine E najmanji u usporedbi sa svim dobivenim rezultatima, dok je u kamenicama ova skupina bila češća od skupina B i C, no njena je vrijednost još uvijek manja od učestalosti skupina B i C kod dagnji.

Posljedično, ako se sagledaju samo vrijednosti za genske skupine AI i B, dagnjama se može pripisati jednaka mogućnost rizika od prijenosa cista giardija iz obje skupine koje invadiraju ljude. Kod kamenica je omjer drukčiji pa je rizik veći podrijetlom od skupine AI.

Dodatna opasnost tih dviju genskih skupina jest u sposobnosti uzrokovanja ko-infekcije s drugima enteropatogenima, poput *Vibrio cholera*, rotavirusa i *Helicobacter pylori*, kada u slučaju infekcije izostaju simptomi, zahvaljujući imunomodulatornim faktorima (Buret i sur., 2015).

Vrativši se na Tablicu 5, može se vidjeti prikaz ustanovljenih genskih skupina u analiziranim dagnjama po lokacijama. To što se rezultati uzgajališta s područja Istre razlikuju, znači da su i razni prenositelji, odnosno izvori cista giardija. U Vabrigi kao i Medulinskom zaljevu, dokazane su genske skupine čiji domaćin može biti čovjek, ali i brojne druge domaće

i divlje životinje. Širokim spektrom mogućih domaćina, životni ciklus giardija poprima takoreći novu dimenziju, u kojoj je kontrola prijenosa i kretanja cista kompliciranija. Rezultati za Raški zaljev upućuju na zagađenje morske vode fecesom pasa, koji vjerojatno često u more dospijeva ušćem rijeke Raše. Genska skupina giardija u pozitivnoj dagnji iz uvale Dinjiške pokazuje kako su njihovi domaćini bili domaći preživači, a to je očekivano s obzirom da se tamošnje stanovništvo prehranjuje uzgojem ovaca. Marinski je zaljev pokazao kao i u slučaju Raškog da su nositelji bili psi. Dagnje iz Malostonskog zaljeva sadržavale su giardije iste genske skupine i podskupine, a s obzirom na lokaciju uzgajališta pretpostavlja se kako je prenosilac često bio čovjek.

Istraživanje (Giangaspero i sur., 2014) mediteranskih dagnji koje su već dospjele u prodajnu mrežu u Italiji pokazalo je kako je 23,3 % školjaka sadržavalo *G. duodenalis*, genske skupine A. Pritom su uzorci iz ljetnih mjeseci pokazali veću učestalost. Moguće objašnjenje leži u tome što je tada više turista, ali je i povećan ispust netretiranih kanalizacijskih voda, podrijetlom iz hotela, kampova i odmarališta. Dodatno, pokazalo se kako je uz giardije u školjkama često prisutan i *Cryptosporidium parvum*, što je znak kako značajnu ulogu u infekciji ljudi imaju domaće životinje. Zdravstvenoj ispravnosti školjaka ne doprinosi ni činjenica da se na tržnicama u jeku ljetne sezone nalaze u neprimjerenom stanju, pomiješane s drugom hranom ili dostupne muhama.

U Tablici 6 prikazano je koje su genske skupine u svakoj od lokacija s kojih su sakupljene kamenice. Školjke s uzgajališta Savudrijska vala i Vabriga sadržavale su ciste iste genske skupine, koja ukazuje kako ulogu prijenosnika ima više vrsta domaćih i divljih životinja te ljudi. Uvala Budava jedina je zona u kojoj je podrijetlo cista svedeno isključivo na domaće i divlje pse. Kako je gradsko središte relativno blizu, logično je da primjerice kišom, feces pasa može dospjeti u more, no isto tako je pomalo začuđujuće kako rezultati sekvencioniranja nisu potvrdili neku gensku skupinu koja invadira i čovjeka. Kamenice s područja Medulinskog zaljeva potvrdile su istu gensku skupinu kao i kod analize dagnji, zbog čega je jasno kako su obje vrste školjaka iz tog uzgajališta podvrgnute istom uzročniku kontaminacije. Isto vrijedi i za usporedbu dagnji i kamenica s područja Vabrige. Genske skupine s pripadajućih paških uzgajališta nanovo su ukazale kako su uzročnici domaći preživači. Na posljetku, sve četiri zone Malostonskog zaljeva bile su onečišćene giardijama iste genske skupine i podskupine, što je dodatno potvrdilo rezultate dobivene za dagnje. S obzirom na visoku učestalost zaraženih kamenica u ovim uzgajalištima, zatim brojnih domaćih i divljih životinja koji mogu poslužiti kao spremnik giardija i uzrokovati infekciju

čovjeka te ljudi kao samostalnih domadara uključenih u životni ciklus giardija, ove rezultate treba posebno naglasiti. Naročito misleći na kulturu prehrane tamošnjeg stanovništva, pogotovo vezano za turističku ponudu.

Usporedba ispitivanih uzgajališta hrvatskog dijela Jadranskog mora s rezultatima dobivenih u talijanskom dijelu, pokazala su slične rezultate. Giangaspero i suradnici (2009) zabilježili su prisutnost giardija genskih skupina A i B u školjkama. Time je određen ljudski faktor u transmisiji. Razlika je bila u učestalosti koja je kod njih bila znatno veća, što je relevantan odraz uzgajališnih uvjeta u laguni.

Raznolikost genskih skupina određenih u ovome radu bila je veća nego u drugim ispitivanjima na školjkašima gdje su određene samo skupine A i B. Ujedno je potvrđena primjenjivost korištene metode u analizi.

5. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem su po prvi puta dokazane vrsno specifične i zoonotske genske skupine bičaša *Giardia duodenalis* u uzgojima školjaka u RH.

Temeljem dobivenih rezultata, odnosno utvrđenih zoonotskih skupina zaključeno je sljedeće:

1. različite životinjske vrste, ali i ljudi izvor su kontaminacije školjkaša
2. ljudi i životinje osim giardija mogu biti asimptomatski domaćini (nositelji) i drugih uzročnika pa poznavanjem specifičnih genskih skupina možemo pretpostaviti i rizik od drugih uzročnika (npr. govedo i *Campilobacter*; pas i *Clostridium*)
3. ispitivane dagnje pokazale su najmanju učestalost u Vabrigi, a najveću u uvali Maslinova na Braču, dok su kamenice najmanju učestalost imale u Savudrijskoj vali, a najveću u zoni Bistrini u Malostonskom zaljevu
4. ustanovljene su četiri genske skupine, od kojih je najčešća bila AI
5. bilo bi neophodno uvrstiti i giardije u dijagnostički algoritam probavnih poremećaja, posebice ukoliko je u anamnezi spomenuto konzumiranje svježih, termički neobrađenih školjaka.

6. LITERATURA

Abeywardena, H., Jex, A.R., Gasser, R.B. (2015) A Perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an Emphasis on Bovines and Recent Epidemiological Findings. U: *Advances in Parasitology* (Rollinson, D., Stothard, J.R., ured.), Elsevier Ltd., Amsterdam, str. 243–301.

Almeida, A., Pozio, E., Cacciò, S.M. (2011) Genotyping of Giardia duodenalis Cysts by New Real-Time PCR Assays for Detection of Mixed Infections in Human Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1895–1901.

Anonymous (2012) Kunjka i kamenica, <http://ribarija.blogspot.hr/2012/10/kunjka-i-kamenica.html>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

Beck, R., Sprong, H., Bata, I., Lucinger, S., Pozio, E., Cacciò, S.M. (2011) Prevalence and molecular typing of Giardia spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. *Vet. Parasitol.* **175**, 40–46.

Beck, R., Sprong, H., Lucinger, S., Pozio, E., Cacciò, S.M. (2010) A Large Survey of Croatian Wild Mammals for *Giardia duodenalis* Reveals a Low Prevalence and Limited Zoonotic Potential. *Vector-borne zoonot.* **11**, 1049-1055.

Beck, R., Sprong, H., Pozio, E., Cacciò, S.M. (2012) Genotyping *Giardia duodenalis* Isolates from Dogs: Lessons from a Multilocus Sequence Typing Study. *Vector-borne zoonot.* **12**, 206-213.

Benchimol, M. (2009) Basic Biology of Gardia lamblia: Further Studies on Median Body and Funis. U: *Giardia and Cryptosporidium: from Molecules to Disease* (Ortega-Pierres, G., Cacciò, S.M., Fayer, R., Mank, T.G., Smith, H.V., Thompson, R.C.A., ured.), CAB International, Wallingford, str. 266-283.

Bernander, R., Palm, J.E.D., Svärd, S.G. (2001) Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol*. **3**, 55-62.

Birkeland, S.R., Preheim, S.P., Davids, B.J., Cipriano, M.J., Palm, D., Reiner, D.S., Svärd, S.G., Gillin, F.D., McArthur, A.G. (2010) Transcriptome analyses of the Giardia lamblia life cycle. *Mol Biochem Parasitol*. **174**, 62-65. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.05.010

Bouchet, P., Rocroi, J.-P., Bieler, R., Carter, J.G., Coan, E.V. (2010) Nomenclator of Bivalve Families with a Classification of Bivalve Families. *Malacologia* [online] **52**, 1–184, <https://www.researchgate.net/profile/Philippe_Bouchet/publication/232677203_Nomenclator_of_Bivalve_Families_with_a_Classification_of_Bivalve_Families/links/556e229608aeab777226a1c2.pdf>. Pristupljeno 24. svibnja 2016.

Bratoš, A., Peharda, M., Crnčević, M. (2003) Bolesti školjkaša. *Naše more* **50**, 72-76.

Buret, A.G., Amat, C.B., Manko, A., Beatty, J. K., Halliez, M.C.M., Bhargava, A., Motta, J.-P., Cotton, J.A. (2015) Giardia duodenalis: New Research Developments in Pathophysiology, Pathogenesis, and Virulence Factors. *Curr. Trop. Med. Rep*. **2**, 110-118.

CABI (2011) *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel). CABI-Centre for Agriculture and Biosciences International, Wallingford, Oxfordshire, <http://www.cabi.org/isc/datasheet/73756>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

Cacciò, S.M., Beck, R., Almeida, A., Bajer, A., Pozio, E. (2010) Identification of Giardia species and Giardia duodenalis assemblages by sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and internal transcribed spacers. *Parasitology* **137**, 919-925.

Cacciò, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., Pozio, E. (2008) Multilocus genotyping of Giardia duodenalis reveals striking differences between assemblages A and B. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1523–1531.

Castro-Hermida, J.A., García-Presedo I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M., Mezo, M. (2009) Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* duodenalis in surface water: A health risk for humans and animals. *Water Res.* **43**, 4133–4142.

CDC (2015) Parasites – Giardia, CDC- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>. Pristupljeno 03. svibnja 2016.

Craft, J.A., Gilbert, J.A., Temperton, B., Dempsey, K.E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T.H., Chipman, J.L. (2010) Pyrosequencing of Mytilus galloprovincialis cDNAs: tissue-specific expression patterns. PLoS One [online] **5**, 8875-8884, <https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2810337_pone.0008875.g001&req=4>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

Čadež, V. (2005) Bolesti školjkaša regulirane zakonom u Republici Hrvatskoj. *Ribarstvo* **63**, 105-116.

DAFF (2012) Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. DAFF-Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Južnoafrička republika, <http://www.nda.agric.za/doaDev/sideMenu/fisheries/03_areasofwork/Aquaculture/BIODIVERSITY/M.%20galloprovincialis%20BRBA%2012.12.12.pdf >. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

Džafić, N., Fumić, T., Njari, B. (2012) Uzgoj dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) kao sigurne hrane. *Meso* **14**, 322-327.

FAO (2016a) Cultured Aquatic Species Information Programme: *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1819). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

FAO (2016b) Cultured Aquatic Species Information Programme: *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

FAOSTAT (2014) World aquaculture production by species groups. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/b-1.pdf>. Pristupljeno 30. svibnja 2016.

Feng, Y., Xiao, L. (2011) Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev*. **24**, 110–140.

Feng, Y., Zhao, X., Chen J., Jin, W., Zhou, X., Li, N., Wang, L., Xiao, L. (2011) Occurrence, Source, and Human Infection Potential of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in Source and Tap Water in Shanghai, China. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3609–3616.

Francavilla, M., Trotta, P., Marangi, M., Breber, P., Giangaspero, A. (2012) Environmental conditions in a lagoon and their possible effects on shellfish contamination by *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Aquacult. Int.* **20**, 707-724.

Geurden, T., Geldhof, P., Levecke, B., Martens, C., Berkvens, D., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E. (2008) Mixed Giardia duodenalis assemblage A and E infections in calves. *Int. J. Parasitol.* **38**, 259–264.

Giangaspero, A., Cirillo, R., Lacasella, V., Lonigro, A., Marangi, M., Cavallo, P., Berrilli, F., Di Cave, D., Brandonisio, O. (2009) *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a Lagoon in Southern Italy. *Parasitol. Int.* **58**, 12–17.

Giangaspero, A., Papini, R., Marangi, M., Koehler, A.V., Gasser, R.B. (2014) Cryptosporidium parvum genotype IIa and Giardia duodenalis assemblage A in Mytilus galloprovincialis on sale at local food markets. *Int. J. Food Microbiol.* **171**, 62-67.

Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Amar, C.F.L., Grant, K.A., Williamson, K., Ares-Mazás, M.E., McLauchlin, J. (2004) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 279– 288.

Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A., Ares-Mazás, E. (2005) *Giardia* in shellfish-farming areas: Detection in mussels, river water and waste waters. *Vet. Parasitol.* **133**, 13–18.

Habdija, I., Primc-Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011) Protista – Protozoa i Metazoa – Invertebrata: strukture i funkcije, Alfa d.d., Zagreb, str. 584.

Helm, M.M., Bourne, N. (2004) Hatchery culture of bivalves: A practical manual. FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5720e/y5720e00.pdf>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

ITIS (2016) ITIS-Integrated Taxonomic Information System, <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=553108>. Pristupljeno 02. svibnja 2016.

Jiménez-Cardoso, E., Eligio-García, L., Cortés-Campos, A., Cano-Estrada, A. (2012) Genotyping of *Giardia intestinalis* Isolates from Dogs by Analysis of gdh, tpi, and bg Genes. U: Parasitology [online] (Shah, M.M., ured.), InTech, Rijeka, str. 67-76, <http://cdn.intechopen.com/pdfs/31809/InTech-Genotyping_of_giardia_intestinalis_isolates_from_dogs_by_analysis_of_gdh_tpi_and_bg_genes.pdf>. Pristupljeno 06. svibnja 2016.

Johnson, C. (2012) The Giardia 'Syndrome' Strikes: Norwegian Studies Suggest 'Minor Bugs' May Commonly Trigger Chronic Fatigue Syndrome As Well. Phoenix Rising, <http://phoenixrising.me/archives/14577>. Pristupljeno 03. svibnja 2016.

Jug-Dujaković, M., Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J. (2011) Zakonska problematika otpremnih centara za školjkaše u Hrvatskoj. *Naše more* **58**, 132-139.

Lapègue, S., Beaumont, A., Boudry, P., Goulletquer, P. (2007) European flat oyster - Ostrea edulis. GenImpact final scientific report, EC/EU, <http://www.imr.no/genimpact/filarkiv/2007/07/european_flat_oyster.pdf/en>. Pristupljeno 24. svibnja 2016.

Lauwaet, T., Gillin, F.D. (2009) Signalling during Giardia differentiation. U: *Giardia and Cryptopsoridium: From Molecules to Disease* (Ortega-Pierres, G., Cacciò, S.M.,

Fayer, R., Mank, T.G., Smith, H.V., Thompson, R.C.A., ured.), CAB International, Wallingford, str. 309–319.

Lipovšćak, B., Lakoš, S. (2014) Meteorologija Jadranskog mora, <http://lipovscak.com/meteo/more.html#struje>. Pristupljeno 09. lipnja 2016.

Manser, M., Granlund, M., Edwards, H., Saez, A., Petersen, E., Evengard, B., Chiodin, P. (2013) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe—a comparative study. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 65-71.

Mašić, M.(2004) Higijena i tehnologija prerade školjaka. *Meso* **6**, 40-45.

Matoničkin, I., Habdija, I., Primc-Habdija, B. (1998) Beskralješnjaci: biologija nižih avertebrata, 3.izd., Školska knjiga, Zagreb, str. 691.

Miller, K.M., Sterling, C.R. (2007) Sensitivity of Nested PCR in the Detection of Low Numbers of Giardia lamblia Cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5949–5950.

Ministarstvo poljoprivrede (2015) Nacionalni strateški plan razvoja akvakulture za razdoblje 2014-2020, <http://www.mps.hr/ribarstvo/UserDocsImages/akvakultura/NSPA%202014-2020_hrv.pdf>. Pristupljeno 30. svibnja 2016.

Miza, S. (2016) Mediterranean mussel. SANBI-The South African National Biodiversity Institute, <http://www.sanbi.org/creature/mediterranean-mussel>. Pristupljeno 27. svibnja 2016.

Morgan, U.M. (2000) Detection and characterisation of parasites causing emerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1407-1421.

Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J.L., Pereira, M.J. (2011) Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. *Food Control* **22**, 805-816.

Papini, R., Cardini, G., Paoletti, B., Giangaspero, A. (2007) Detection of *Giardia* assemblage A in cats in Florence, Italy. *Parasitol. Res.* **100**, 653-656.

Pećarević, M., Bratoš, A. (2004) Standardi kakvoće, prerada i pakiranje kamenica. *Naše more* **51**, 69-73.

Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša (2009) *Narodne novine* **31**, Zagreb.

Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (2007) *Narodne novine* **99**, Zagreb.

Robertson, L.J. (2007) The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 201-216.

Roxström-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., Svärd, S.G. (2006) Giardia immunity – an update. *Trends Parasitol.* **22**, 26-31.

Schets, F.M., van den Berg, H.H., Engels, G.B., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol*. **113**, 189-194.

Schets, F.M., van den Berg, H.H.J.L., Engels, G.B., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 189–194.

Shalaby, N.M., Wakid, M.H. (2014) Giardiasis in Man: Review and Updates. *JKAU: Med. Sci.* **21**, 87-100.

Smith, H.V., Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., Tait, A. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol*. **149**, 29–40.

Sommer, M.F., Beck, R., Ionita, M., Stefanovska, J., Vasić, A., Zdravković, N., Hamel, D., Rehbein, S., Knaus, M., Mitrea, I.L., Shukullari, E., Kirkova, Z., Rapti, D., Capári, B., Silaghi, C. (2015) Multilocus sequence typing of canine Giardia duodenalis from South Eastern European countries. *Parasitol. Res.* **114**, 2165-2174.

Sprong, H., Cacciò, S.M., van der Giessen, J.W.B. (2009) Identification of Zoonotic Genotypes of Giardia duodenalis. *PLoS Negl.Trop. Dis.* **3**, 558-569. doi:10.1371/journal.pntd.0000558

Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L. (2003) Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1444-1452.

Šerić, N. (2007) Podmorje otoka Brača. U: *Brački zbornik br.22* (Šimunović, I., ured.), Naklada Bošković, Supetar, str. 521-532.

Tedde, T., Piras, G., Salza, S., Nives, R.M, Sanna, G., Tola, S., Culurgioni, 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. *Ital. J. Food Saf.* **2**, 91-93.

Thompson, R.C.A. (2009) The Impact of Giardia on Science and Society. U: *Giardia and Cryptosporidium: from Molecules to Disease* (Ortega-Pierres, G., Cacciò, S.M., Fayer, R., Mank, T.G., Smith, H.V., Thompson, R.C.A., ured.), CAB International, Wallingford, str. 1-11.

Thompson, R.C.A., Monis, P. (2012) *Giardia*—From Genome to Proteome. U: *Advances in Parasitology* (Rollinson, D., Hay, S.I., ured.), Elsevier Ltd., Amsterdam, str. 57-95.

Thompson, R.C.A., Monis, P.T. (2004) Variation in Giardia: Implications for Taxonomy and Epidemiology. *Adv. Parasitol*. **58**, 69–137.

Toze, S. (1999) PCR and the Detection of Microbial Pathogens in Water and Wastewater. *Wat. Res.* **33**, 3545-3556.

Tungtrongchitr, A., Sookrung, N., Indrawattana, N., Kwangsi, S., Ongrotchanakun, J., Chaicumpa, W. (2010) *Giardia intestinalis* in Thailand: Identification of Genotypes. *J. Health Popul. Nutr.* **8**, 42-52.

Verweij, J.J., Blangé, R.A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E.A.T., van Rooyen, M.A.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M. (2004) Simultaneous Detection of Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, and Cryptosporidium parvum in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1220–1223.

Willis, J.E., McClure, J.T., Davidson, J., McClure, C., Greenwood, S.J. (2013) Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: Should Canada take a closer look? *Food Res. Int*. **52**, 119–135.