

Epidemiologija *Cryptosporidium* spp. u školjkaša iz akvakulture

Penović, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:380413>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

Nikolina Penović

EPIDEMIOLOGIJA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U
ŠKOLJKAŠA IZ AKVAKULTURE

Diplomski rad

Split, lipanj 2019.

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

EPIDEMIOLOGIJA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U
ŠKOLJKAŠA IZ AKVAKULTURE

Diplomski rad

Predmet: Parazitologija morskih organizama

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Ivona Mladineo

Student:

Nikolina Penović

Komentor:

dr. sc. Slaven Jozić

Split, lipanj 2019.

ZAHVALE

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Ivoni Mladineo i komentoru dr. sc. Slavenu Joziću na ukazanom povjerenju i pomoći te savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala kolegama Luki Žuviću i Jerku Hrabaru, a posebno kolegici Anamariji Vrbatović, na pomoći i savjetima prilikom izvođenja praktičnog dijela diplomskog rada.

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

Hvala dr. Kristin Elwin na savjetima i materijalima koji su uvelike olakšali izradu ovog rada.

Hvala svim profesorima Sveučilišnog odjela za studije mora na prenesnom znanju kroz ovih pet godina.

Ovaj diplomski rad izraden je zahvaljujući COSTA Action FA1408 European Network for Foodborne Parasites in Europe Euro-FBP Training School: Molecular methods used for foodborn parasite diagnostics in different matrices, organiziranoj u Lisabonu, Portugal, 4-7 rujna 2017. godine.

I na kraju veliko hvala mojim roditeljima, sestri i Tomi na podršci koju su mi pružali tijekom studiranja. Hvala vam na ljubavi i što me uvijek tjerate da budem bolja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

EPIDEMIOLOGIJA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U ŠKOLJKAŠA IZ AKVAKULTURE

Nikolina Penović

Sažetak

U ovom diplomskom radu predstavljeni su rezultati istraživanja prisutnosti protozoarnog nametnika *Cryptosporidium* spp. i enterokoknih bakterija u sredozemne dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) iz akvakulture. Jedinke korištene u istraživanju prikupljene su na uzgajalištu Stipan Jaz u Marini pokraj Trogira, ostavljene su dva dana u moru izloženom mikrobiološkom onečišćenju (u blizini Kaštel Sućurca), a potom su postavljene u tri pokusna bazena za pročišćavanje sa slobodnim protokom morske vode, na Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Analizirano je 240 uzoraka, od čega 120 uzoraka škrgi i 120 uzoraka plašta dagnji, prikupljenih tijekom četiri vremenske točke: nulto stanje prilikom postavljanja u bazene, te nakon 12, 24 i 48 sati pročišćavanja. *Cryptosporidium* spp. analiziran je iz uzoraka škrgi i plašta dagnji ugniježđenom lančanom reakcijom polimerazom, međutim, bez pozitivnog rezultata. Na to je mogla utjecati vremensko razdoblje u kojem su školjkaši bili pod antropogenim utjecajem, jako niska koncentracija oocista pristunih u moru u Kaštel Sućurcu, te određeni kemijski i fizički čimbenici (amonijak, pH, salinitet, temperatura, sunčevo zračenje, nedostatak oborina). Istraživanje koncentracije enterokoknih bakterija dalo je očekivane rezultate iz kojih je vidljiva visoka početna koncentracija enterokoknih bakterija koja nakon 48 sati pročišćavanja značajno opada. Može se zaključiti da *Cryptosporidium* spp. nema, ili ga ima u tako malim količinama koje nisu dovoljne da se akumulira i dokaže u dagnji, te samim time ne predstavlja opasnost za čovjeka. Ujedno, dagnje se kroz 48 sati pročišćavanjem oslobode enterokoknih bakterija do razine koncentracija koje su prihvatljive za konzumaciju.

(68 stranica, 20 slika, 18 tablica, 84 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Cryptosporidium* spp, crijevni enterokoki, *Mytilus galloprovincialis*, PCR, Sredozemno more

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

Komentor: dr. sc. Slaven Jozić

- Ocjenjivači:**
1. Doc. dr. sc. Maja Krželj
 2. Izv. prof. dr. sc. Ivona Mladineo
 3. Dr. sc. Slaven Jozić, znanstveni suradnik

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Marine Fishery

MSc Thesis

EPIDEMIOLOGY OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. IN SHELLFISH FROM AQUACULTURE

Nikolina Penović

Abstract

The results of research on the presence of protozoan *Cryptosporidium* spp. and enterococci in the Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from aquaculture are presented in this thesis. Specimens used in this research were collected from the farming site Stipan Jaz in Marina near Trogir, left for two days in the marine environment exposed to microbiological contamination (nearby Kaštel Sućurac) and subsequently placed in the three experimental pools for purification with flow-through seawater system, at the Institute of oceanography and fisheries, Split. In total 240 samples were processed; 120 gill and mantle samples collected during four time points: 0, 12, 24 and 48 h after placement in the experimental pools. The presence of *Cryptosporidium* spp. was analysed from gills and mantle using nested PCR, however with no positive result. This may be due to the insufficient time that mussels were held under the microbiological contamination in the marine environment, very low concentration of oocyst in the sea column in the Kaštel Sućurac, and/ or certain chemical and physical factors (ammonia, pH, salinity, temperature, sun radiation, lack of rainfall). Analysis of the concentration of enterococci gave the expected results that show a high initial concentration of enterococci, which after 48 hours of purification, significantly decreases. It can be concluded that *Cryptosporidium* spp. is not present or is present in very low quantity, being not enough to accumulate and become detectable in mussels, therefore not posing a risk to humans. In addition, after 48 hours held in purification system, mussels decrease their initial concentration of enterococci to acceptable concentrations.

(68 pages, 20 figures, 18 tables, 84 references, original in: Croatian)

Keywords: *Cryptosporidium* spp, intestinal enterococci, *Mytilus galloprovincialis*, PCR, Mediterranean

Supervisor: Ivona Mladineo, PhD / Associate Professor

Co-supervisor: Slaven Jozić, PhD / Research Assistant

Reviewers:

1. Maja Krželj, PhD / Assistant Professor
2. Ivona Mladineo PhD / Associate Professor
3. Slaven Jozić, PhD / Research Assistant

Sadržaj

1. UVOD	1
1.2. Rod <i>Cryptosporidium</i> spp.	2
1.2.1. Morfologija i životni ciklus <i>Cryptosporidium</i> spp.....	4
1.2.2. Vrste <i>Cryptosporidium</i> spp. u moru.....	6
1.2.3. Vrste <i>Cryptosporidium</i> spp. koje uzrokuju infekcije ljudi.....	6
1.3. Prijenosni putevi	7
1.3.1. Prijenos s osobe na osobu.....	7
1.3.2. Zoonotički prijenos.....	9
1.3.3. Prijenos putem vode.....	9
1.3.4. Prijenos putem hrane.....	10
1.4. Bakterije	10
1.4.1. Porodica <i>Enterococcaceae</i>	11
1.4.2. <i>Enterococcus</i> spp.	11
1.4.2.1. Crijevni enterokoki.....	12
1.4.2.2. Enterokoki u okolišu.....	13
1.5. Školjkaši	14
1.5.1. Sredozemna dagnja – <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819).....	15
1.5.2. Praćenje kakvoće mora i školjkaša na uzgajalištima u Republici Hrvatskoj.....	16
1.6. Dosadašnja istraživanja	17
1.6.1. Prisutnost oocista <i>Cryptosporidium</i> spp. u dagnje (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) i brbavice (<i>Venus verrucosa</i>) u Jadranskom moru.....	17
1.6.2. Preživljavanje enterokoknih bakterija u području bogatom nutrijentima.....	18
1.7. Svrha i cilj rada	18
2. MATERIJALI I METODE	20
2.1. Uzorkovanje i priprema školjkaša za pretragu na <i>Cryptosporidium</i> spp.	20
2.2. Molekularna analiza <i>Cryptosporidium</i> spp. u tkivu školjkaša	22
2.2.1. Izolacija DNA iz homogenata škrga i plašta sredozemne dagnje.....	22
2.2.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA.....	24
2.2.3. Ugnježdjena lančana reakcija polimerazom DNA uzoraka.....	40
2.2.4. Gel elektroforeza.....	44
2.3. Određivanje najvjerojatnijeg broja <i>Enterococcus</i> spp. u uzorcima dagnji	45
3. REZULTATI I RASPRAVA	50

3.1. Parazitološka pretraga sredozemne dagnje na prisustvo nametnika <i>Cryptosporidium</i> spp.	50
3.2. Bakteriološka pretraga sredozemne dagnje na prisustvo enterokoknih bakterija	57
4. ZAKLJUČAK.....	60
5. LITERATURA	61

1. UVOD

U Sredozemnom su području ljudi od davnina vezani za more koje im je bilo izvor zarade, ali i hrane. Uz ribe, najčešće su konzumirani školjkaši, i to vrste europska kamenica (*Ostrea edulis*) i sredozemna dagnja (*Mytilus galloprovincialis*). U 2017. u Hrvatskoj je proizvedeno skoro 300 tona više dagnji u odnosu na 2016. godinu (Tablica 1). Osim što se nabavljaju od uzgajivača i u trgovinama, ljudi često sami prikupljaju dagnje iz prirode, s obzirom na to da rastu na pristupačnim mjestima te nije potrebna nikakva posebna vještina za prikupljanje.

Tablica 1. Proizvodnja marikulture u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2013. – 2017. prikazana u tonama (izvor: <https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=14>).

Vrsta	2013.	2014.	2015.	2016.	2017.
Dagnja	1.950	714	746	699	920
Kamenica	50	32	52	64	62
Jakovljeva kapica			0,016	0,06	0,04
Tuna	2.616	2.224	2.603	2.934	2.162
Lubin	2.826	3.215	4.075	5.310	5.616
Komarča	2.978	3.655	4.488	4.101	4.830
Hama	44	60	67	125	253
Zubatac	6	40	4	1	
Pastrva	4	13			
Romb		0,5	7	0,5	
Pagar		40			
Total (t)	10.474	9.960	12.043	13.235	13.843

Školjkaši su filtratori, hrane se filtriranjem hranjivih tvari iz vode kroz škržne lamele i sve što se nalazi u morskom okolišu prolazi kroz njihov organizam, čime se osobe koje ih konzumiraju termički neobrađene dovode u opasnost od prenošenja toksina, bakterija i nametnika nakupljenih u tkivima školjkaša. Zbog toga je neophodno provesti određene kontrole prije stavljanja školjkaša na tržište.

Prema Planu za praćenje kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša, u Republici Hrvatskoj uzorkuju se školjkaši za određivanje biotoksina, mikrobiološke kakvoće, teških metala i benzo(a)pirena, benzo(a)antracena, benzo(b)fluorantena i krizena. Istraživanje prisutnosti nametnika u školjkaša zakonom je određeno samo za nametnike koji su uzročnici bolesti školjkaša.

Vode s kopna, ispiranjem, donose u more razvojne stadije nametnika koje potom školjkaši filtriranjem akumuliraju u svom organizmu. Neki od nametnika koji se mogu pronaći u školjkašima jesu predstavnici koljena Apicomplexa – truskovci, kao npr. *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. U to koljeno spadaju nametnički eukarioti koji u nekom razdoblju života sadrže apikalni kompleks po kojem je cijela skupina dobila naziv. On se nalazi na prednjem dijelu tijela razvojnog stadija ili sporozoita, zvan apikalni kraj, i čini ga skup organela: mikroneme, roptrije, polarni prsten, sastavljen od mikrotubula, i konoidi. Apikalni kompleks služi za interakciju nametnika s domaćinom i ulazak u stanicu domaćina.

Apicomplexa je velika i raznolika skupina obligatnih endoparazita, nesposobnih za aktivan život van domaćina. Većina vrsta je patogena, a mnoge od njih štetno djeluju na ljudsko zdravlje (*Plasmodium*, *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Cyclospora*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*). Infekcije izazivaju sporozoiti, infektivni oblici koji napadaju stanice i iz kojih se nespolnom reprodukcijom ili merogonijom razvijaju meronti. Oociste Apicomplexa nastaju fuzijom gameta, a veličina varira ovisno o rodu. Tako vrste roda *Cryptosporidium* imaju oociste veličine 4 – 5 µm, roda *Cyclospora* 8 – 10 µm, a *Isospora* 30 x 12 µm.

Osim nametnika, školjkaši akumuliraju i bakterije, među kojima su i enterokokne bakterije, zbog čega se uzimaju kao pokazatelji zagađenja.

1.2. Rod *Cryptosporidium* spp.

Predstavnici roda *Cryptosporidium* jesu protozoarni nametnici koji parazitiraju u području mikrovila epitelnih stanica gastrointestinalnog trakta kralješnjaka (Hunter i sur., 2007).

Predstavnici su koljena Apicomplexa, parazitiraju uz samu površinu stanice ili u četkastom porubu stanične membrane, i to intracelularno ili vancitoplazmatski (Levine, 1985). Prvi koji je opisao rod *Cryptosporidium* bio je Ernest Edward Tyzzer koji je 1907. dao kratak opis vrste *Cryptosporidium muris* izolirane iz želučane žlijezde laboratorijskog miša. Nekoliko godina kasnije, točnije 1912., opisao je *C. parvum* koja se od prethodne vrste razlikuje u tri osobitosti: mjestu infekcije – inficira crijevne epitelne stanice i ne prodire dublje u crijevnu sluznicu (Laurent i sur., 1997), manjim oocistama (4,9 x 4,4 μm) i razvojnoj morfologiji poglavito jer za razliku od *C. muris* nema čvoraste organele.

Do danas je opisano 25 različitih vrsta roda *Cryptosporidium*, većina ih je specifična za svog domaćina, a čak 50 % njih ima potencijal prenijeti se sa životinje na čovjeka pa ih smatramo zoonotičnim nametnicima. *C. hominis* najčešće se spominje u slučaju humanih infekcija, dok je *C. parvum* najmanje domaćin-specifičan (Slika 1).



Slika 1. Oociste vrste *Cryptosporidium parvum* s vidljivim sporozoitima (izvor: <https://www.dpd.cdc.gov>).

Druge vrste koje su se pokazale kao mogući humani patogeni jesu *C. meleagridis*, prvenstveno povezan s infekcijom puradi, ali identificiran i kod djece u Južnoj Americi; te *C. cuniculus*, povezan sa zečjim infekcijama, ali koji se danas spominje i kao jedan od uzročnika vodene kriptosporidioze. Neke se vrste povezuju sa sporadičnim slučajevima humanih infekcija, kao što je *C. ubiquitum*, ili s infekcijama kod ljudi oslabljenog imunološkog sustava

(imunodeficientne osobe). To pretpostavlja da ove vrste, iako nisu prilagođene na život u ljudskom organizmu, ponekad mogu biti uzročnici infekcija čovjeka (Caccio i Widmer, 2014).

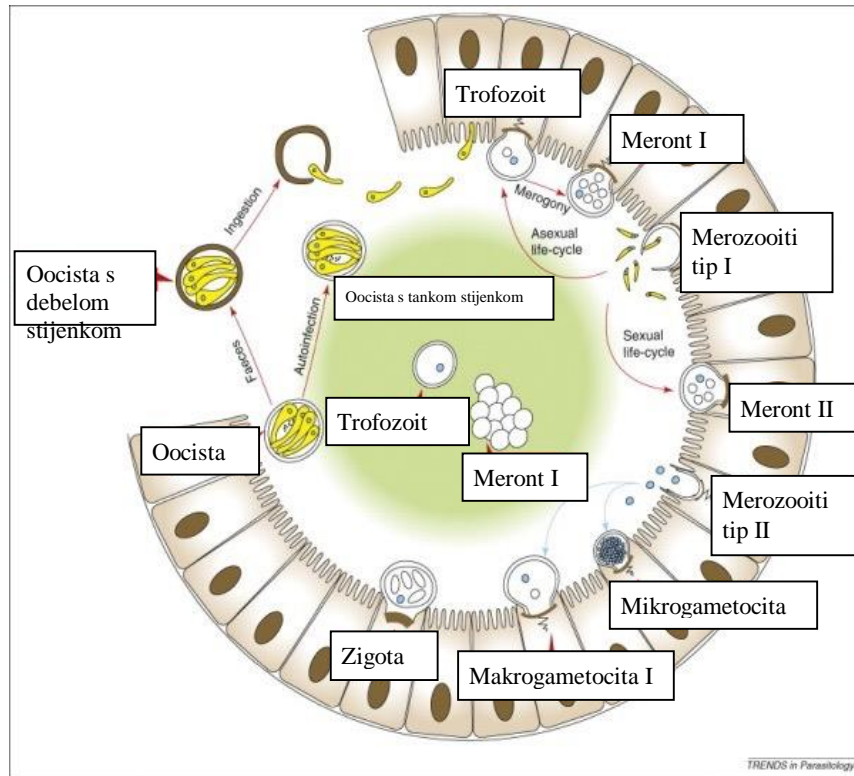
Ovi nametnici uzrokuju proljev kod imunokompetentnih pacijenata, a infekcije mogu biti kronične i za život kritične kod imunodeficientnih osoba (Hunter i sur., 2007). Inkubacijsko razdoblje traje otprilike sedam dana, s rasponom od jedan do četrnaest dana, dok sama bolest traje između šest i devet dana (Hunter i sur., 2007). Nisu neuobičajena ponavljanja infekcija, i to u 40 – 70 % pacijenata (Hunter i sur., 2004). Kriptosporidioza se može dobiti neposrednim dodiranjem sa zaraženom osobom ili životinjom te ingestijom kontaminirane hrane ili vode (Xiao, 2010).

Osim 25 vrsta *Cryptosporidium* spp., poznato je preko 40 različitih genotipova ovog nametnika te je velika vjerojatnost da će većina njih dobiti status vrste, obzirom na sve učestaliju biološku i molekularnu tipizaciju. Molekularni alati, poput lančane reakcije polimerazom (polymerase chain reaction; PCR) i DNA sekvenciranja, potrebni su kako bi se pouzdano identificirale vrste i genotipovi *Cryptosporidium* spp. Nuklearni filogenetski biljezi poput 18S gena ribosomalne RNA (*rRNA*) i hipervarijabilni 60-kDa glikoprotein (*gp60*) danas se koriste u identifikaciji vrsta (Ng i sur., 2011).

1.2.1. Morfologija i životni ciklus Cryptosporidium spp.

Nametnici *Cryptosporidium* spp. imaju tri razvojna stadija: meronte, gamonte i sporozoite unutar oocista. Unutrastanični razvojni stadiji, meronti i gamonti predstavljaju mala bazofilna tijela veličine 3 – 6 µm, koja se prihvaćaju na luminalnu površinu enterocita domaćina. Vanstanične oociste su jajolika fazno-svijetla tjelešca veličine 5 – 7 x 4 – 6 µm koje sadrže četiri sporozoita i residualno tijelo. Glavni dio residualnog tijela jesu amilopektinska zrnca koja predstavljaju rezervu ugljikohidrata neophodnu u različitim fazama životnog ciklusa pripadnika koljena Apicomplexa (Harris i sur., 2004).

Čitavi životni ciklus nametnika odvija se u jednom domaćinu, a uključuje nespolnu i spolnu fazu reprodukcije (Slika 2).



Slika 2. Životni ciklus *Cryptosporidium* spp. (prema Thomson, Clode i Borowski, 2008.).

Nakon ingestije, oocista u domaćinu ekscistira oslobađajući četiri sporozoita srpastog oblika koji kroz mikrovile parazitirane stanice ulaze u stanicu domaćina pokretima savijanja i uvrtnja gdje se razvijaju u okruglaste jednojezgrene trofozoite.

Nespolnim razmnožavanjem ili merogonijom (ili shizogonijom) jezgre trofozoita dijele se, čime se razvijaju dva tipa meronta ili shizonata. Tip I meronta sadrži šesto do osam jezgri koje se spajaju u šest do osam merozoita, koji mogu odmah inficirati nove stanice gdje će se preobraziti u tip I ili tip II. Potpuno razvijen tip II meront sadrži četiri merozoita. Merozoiti iz meronta tipa II inficiraju nove stanice, gdje potom započinje spolno razmnožavanje ili gametogonija. U ovom procesu nastaju i sazrijevaju mikrogametocite (muške spolne stanice) i makrogametocite (ženske spolne stanice). Unutar zrelih makrogametocita nalaze se makrogamete, a unutar mikrogametocita, 14 – 16 mikrogameta nalik na spermije (Huzjak, 1999).

Oplodnjom makrogamete mikrogametom nastaje zigota koja će se razvojem ovojnice pretvoriti u oocistu. Ona može imati tanku i osjetljivu, ili debelu ovojnicu (Janof i Reller, 1987). Oociste s tankom ovojnicom, zastupljene su oko 20 % od ukupnog broja razvijenih oocista, sporuliraju *in situ* na mjestu prvotne infekcije te oslobođeni sporozoiti uzrokuju autoinfekciju.

Oociste s debelom ovojnicom također sporuliraju, ali u vanjskom okolišu. Zbog velike brzine odvijanja, sama oplodnja je rijetko vidljiva.

1.2.2. Vrste *Cryptosporidium* spp. u moru

Cryptosporidium spp. je opisan u slatkovodnim i morskim ribljim vrstama, a različiti stadiji nametnika pronađeni su na mikrovilima epitela želudca i crijeva. Nekolicina vrsta *Cryptosporidium* spp. pronađena je u morskim sisavcima i ribama. Prva vrsta *Cryptosporidium* identificirana u ribi jest *C. nasorum* izolirana iz tropskih vrsta ribe-kirurga (*Naso tang* i *N. liuratus*) (Hoover i sur., 1981; Pavlasek, 1983). Paperna i Vilenkin (1996) dodatno su identificirali tri vrste; *Piscicryptosporidium reinchenbachklinkei* u probavilu guramija (*Trichogaster leeri*), *P. cichlidis* u probavilu cilkida (*Oreochromis* sp.) i *Piscicryptosporidium* sp. u trbuhu komarče (*Sparus aurata*). *Cryptosporidium* sp. pronađen je u crijevima romba (*Scophthalmus maximus*) (Alvarez-Pellitero i sur., 2004), a *C. molnari* u želudcu i crijevima komarče i lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Barugahare i sur., 2011; Palenzuela i sur., 2010). Posljednja vrsta pronađena u ribe jest *C. parvum* u silaga (*Sillago vittata*) (Gibson-Kueh i sur., 2011), iako je najviše istraživanja provedeno na lubinu (Alvarez-Pellitero i Sitja-Bobadilla, 2002), a najmanje na školjkašima kao primarnim domaćinima ovog nametnika.

Ujedno, molekularnim istraživanjima utvrđena su četiri genotipa *Cryptosporidium* spp. u tuljana. Genotip 1 AY731234 (AY731236-*hsp70*), genotip 2 AY731235 (AY731238-*hsp70*), genotip 3 JN858909 (JN860884-*hsp70*) i genotip 4 JQ740103 (JQ740105-*hsp70*) (Rengifo-Herrera i sur., 2011; 2013).

1.2.3. Vrste *Cryptosporidium* spp. koje uzrokuju infekcije ljudi

Prvi slučajevi kriptosporidijaze kod čovjeka pojavili su se 1976. (Meisel i sur., 1976; Nime i sur., 1976). Oboljeli su bili 3-godišnje dijete i 39-godišnji muškarac kojima je zajednički bio suživot na farmi s govedima i psima. Oboje su imali kliničku sliku teškog vodenastog proljeva. Dijagnoza se temeljila na mikroskopskom pregledu brisa rektuma i biopsiji središnjeg dijela tankog crijeva. Kako u to vrijeme nije bilo mogućnosti točno identificirati vrstu, infekcija se pripisala *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. počeo se smatrati ozbiljnim humanim patogenom tek 1980-ih kada je nametnik u osoba zaraženih virusom humane imunodeficijencije (HIV) prouzrokovao vrlo ozbiljne i po život opasne infekcije, tijekom kojih se nametnik može proširiti na čitav dišni i probavni sustav (Ma i Soave, 1983; Navin i Juranek, 1984). Nakon toga uslijedila je velika epidemija kriptosporidijoze 1993. u Wisconsinu, SAD s više od 400 000 zaraženih, dokazavši da na oociste *Cryptosporidium* spp. ne djeluje pročišćavanje vode te se nametnik može prenositi putem vode za piće. Ovo je neposredno dovelo do razvoja molekularnih metoda za točniju i bržu detekciju i identifikaciju vrsta *Cryptosporidium* u različitim uzorcima, što je poboljšalo razumijevanje taksonomije i epidemiologije samog roda. Devedesetih godina prošlog stoljeća istraživanja su prvi put pokazala da ljude inficiraju dva oblika nametnika roda *Cryptosporidium*; vrsta jednaka onoj pronađenoj u govedu (*Bos taurus*), odnosno druga vrsta specifična za ljude (Ortega i sur., 1991; Nina i sur., 1992; Ogunkolade i sur., 1993). Razne studije temeljene na analizi jednog ili više genetičkih biljega (Peng i sur., 1997; Spano i sur., 1998) pokazale su postojanje dvije genetički zasebne podgrupe unutar *C. parvum*; H (human) i C (cattle), odnosno tip 1 i tip 2.

Zahvaljujući novijim istraživanjima genetskih i bioloških razlika, *C. hominis*, prethodno poznat kao *C. parvum* tip 1, predložen je kao nova vrsta koja inficira isključivo ljude (Morgan-Ryan i sur., 2002). Napretkom genetike i epidemiologije uočeno je da više od 90 % kriptosporidijaze ljudi uzrokuju *C. parvum* i *C. hominis* (Xiao, 2010), ali i druge vrste, kao što su *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. ubiquitum* i *C. viatorum*, koje također mogu inficirati ljude.

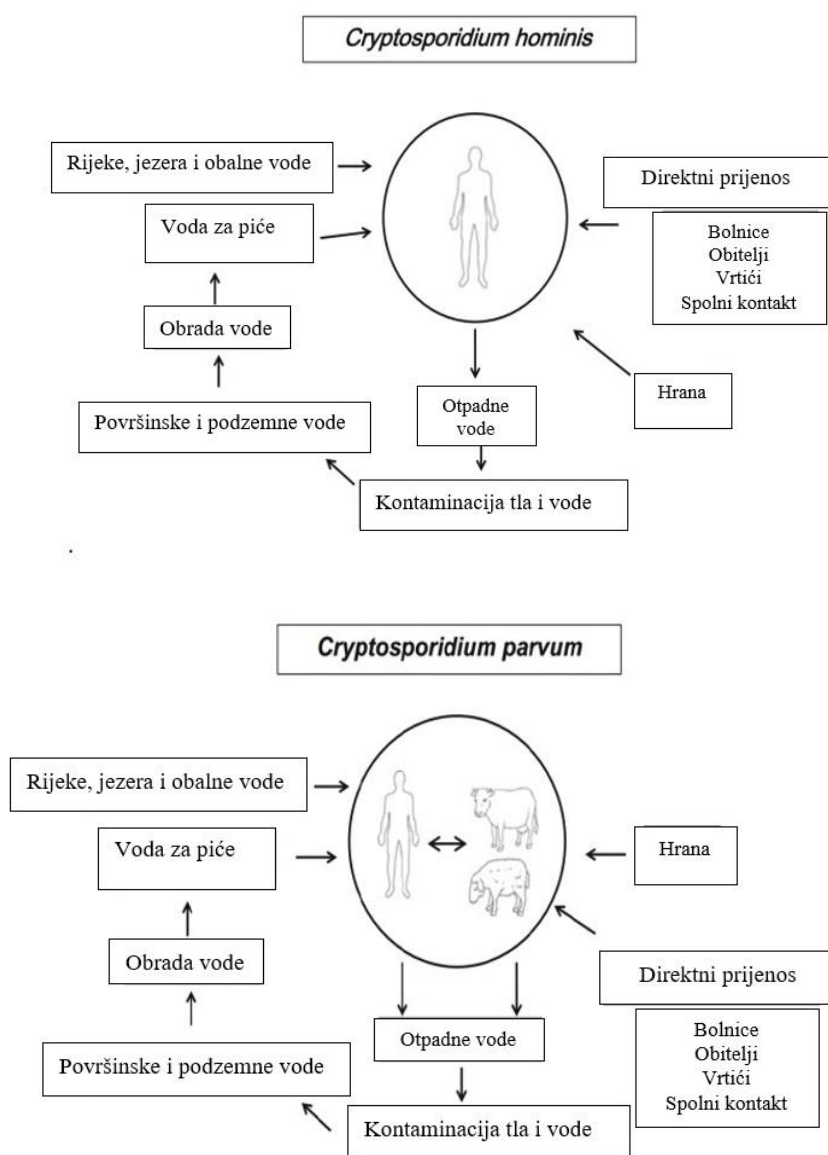
1.3. Prijenosni putevi

Više je različitih prijenosnih puteva kojima se ljudi mogu inficirati *Cryptosporidium* spp. Glavni prijenosni putevi u čovjeka jednaki su za *C. hominis* i *C. parvum* (Slika 3).

1.3.1. Prijenos s osobe na osobu

Cryptosporidium spp. vrlo se lako prenosi među djecom i djelatnicima u jaslicama (Hannah i Riordan, 1988), vrtićima (Heijbel i sur., 1987) i školama (Lee i Greig, 2010). Zabilježene su i bolničke infekcije koje su česte među osobama istog kućanstva (Bruce i sur., 2000) i članovima obitelji (Pandak i sur., 2006).

Prijenos može biti posredan i neposredan. Neposredan je moguć dodirom zaražene osobe, primjerice rukovanjem kontaminiranom rukom, a kod posrednog prijenosa najčešći je spolnim putem kod homoseksualnih HIV pozitivnih muškaraca. Studija u Australiji pokazala je da muškarci koji imaju više od jednog spolnog partnera često pate od dijareje uzrokovane *Cryptosporidium* spp. (Hellard i sur., 2003).



Slika 3. Glavni prijenosni putevi vrsta *C. hominis* (gore) i *C. parvum* (dolje) (prema Xiao, 2009).

1.3.2. Zoonotički prijenos

C. parvum proširen je na farmama životinja, posebice među mladim životinjama. Sve osobe koje dođu u dodir sa zaraženim životinjama u opasnosti su od infekcije, pa je tako kriptosporidijaza česta u veterinarima i studenata veterine (Gait i sur., 2008), osoba u dodiru sa životinjama u uzgoju (Stantic-Pavlinic i sur., 2003) i djece koja su posjećivala farme (Hoek i sur., 2008). Zbog visoke prevalencije *C. parvum* i velikog broja oocista u fecesu ($> 5 \times 10^6$ oocista/g), smatra se da govedo predstavlja najveći rizik zagađenja okoliša i prijenosa infekcije na ljude (Current i sur., 1983). Epidemiološka istraživanja pokazala su povezanost ovaca s kriptosporidijazom ljudi (Casemore, 1989), što je kasnije potkrijepljeno molekularnim istraživanjima. Ovo je posebice izraženo u Velikoj Britaniji gdje je pet slučajeva ljudskih infekcija uzrokovao dodir sa živim janjcima u procesu prelaska s majčinog mlijeka na prehranu namijenju odraslim jedinkama (Chalmers i Giles, 2010). Zečevi su prirodni domaćini *C. cuniculus* (Robinson i sur., 2010), vrste za koju je danas prihvaćeno da uzrokuje infekciju ljudi. Zoonotički prijenos *C. meleagridis*, ptičjeg nametnika koji može inficirati ljude, zabilježen je u Švedskoj (Silverlas i sur., 2012), a rezultati molekularnih analiza ukazali su na kokoši kao izvore zaraznih oocista. Još uvijek izgleda da ribe, gmazovi i vodozemci ne predstavljaju rizik za kriptosporidijazu ljudi.

1.3.3. Prijenos putem vode

Infekcije putem vode jesu globalni javnozdravstveni problem. Velika prisutnost *Cryptosporidium* spp. u vodenom okolišu objašnava se velikim brojem domaćina, sve većim brojem oocista i njihovoj stabilnosti u okolišu (Smith i sur., 2006). U zadnjem desetljeću čak 56,3 % infekcija *Cryptosporidium* spp. nastalo je preko vode. Kriptosporidijaza je najčešća gastrointestinalna bolest u izbijanju (engl. *emerging disease*) povezana s tretiranim rekreacijskim vodenim prostorima u SAD-u (Yoder i Beach, 2007). Epidemije čovjeka javile su se nakon korištenja bazena, vodenih parkova i fontana, obično uzrokovane *C. hominis* i *C. parvum*. Uloga vode u prijenosu *Cryptosporidium* spp. u državama u razvoju manje je istražena zbog nedostatka sanitarnih i parazitoloških kontrola vode (Mak, 2004).

1.3.4. Prijenos putem hrane

Kontaminacija oocistama *Cryptosporidium* spp. putem hrane zabilježena je diljem svijeta, a istraživanja su najviše bila fokusirana na voće i povrće kao izvor infekcije, s obzirom na to da se radi o hrani koja se često konzumira sirova ili slabo termički obrađena (Robertson i Chalmers, 2013).

Kontaminacija *Cryptosporidium* spp. putem hrane nije uobičajena samo za zemlje u razvoju. U Norveškoj, u razdoblju od 1999. do 2001. godine, od ukupno 475 uzoraka testiranog voća i povrća, 29 (6,11 %) ih je bilo pozitivno na oociste *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp., od čega 19 (4 %) na *Cryptosporidium* spp. (Robertson i Gjerde, 2001).

Osim voća i povrća, kao izvor epidemije navode se i mliječni proizvodi te voćni sokovi. U Velikoj Britaniji i Australiji zabilježena je epidemija nakon konzumacije nepasteriziranog kravljeg mlijeka (Harper i sur., 2002), a u SAD-u nakon konzumacije ozoniziranog soka od jabuke (Blackburn i sur., 2006). Istraživanja su dokazala da izvor kontaminacije mogu biti osobe koje rade u objektima za preradu i prodaju hrane (Robertson i Chalmers, 2013).

Školjkaši se konzumiraju uglavnom sirovi, a s obzirom na to da filtriraju velike količine vode, postoji mogućnost akumuliranja oocista *Cryptosporidium* spp., zbog čega mogu predstavljati izvor infekcije (Robertson, 2007). Kod nekih vrsta školjkaša, kao što su dagnja, kamenica i kunjka (*Arca noae*), pronađene su nakupljene oociste *Cryptosporidium* spp. u probavnom traktu (Caccio i Widmer, 2014). Međutim, značajno je napomenuti da nametnik ne uzrokuje infekciju školjkaša, već se pasivno nakuplja u njegovu tkivu tijekom prehrane školjkaša koji nastanjuje sredinu zagađenu oocistama.

1. 4. Bakterije

Bakterije su jednostanični prokariotski organizmi mikroskopske veličine. Zaštićene su dvijema ovojnicama, staničnom stijenkom i staničnom membranom, a neke imaju i treći zaštitni sloj – kapsulu, unutar koje se nalazi prstenasta molekula DNA ili nukleoid. Na površini bakterija mogu se nalaziti flagele koje služe za pokretanje te kratki pili koji joj pomažu pričvršćivanju na površinu domaćina.

Više je različitih kriterija kojima možemo klasificirati bakterije, ali osnovna je podjela prema morfologiji i građi stanične stijenke, što se određuje tehnikom bojenja po Gramu. Stoga postoje Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Tehnika je ime dobila po Hans Christianu Gramu koji ju je razvio još 1884. godine (Vidyasagar, 2015).

Osim autohtonih bakterija kojima je more prirodni okoliš, postoje i alohtone bakterije koje u more dospijevaju između ostalog i putem otpadnih voda. Na taj način u more dospijevaju i određeni patogeni koji predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i životinja. Patogene bakterije najčešće pripadaju rodovima *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Yersinia* i *Staphylococcus*. Većinu navedenih rodova moguće je izolirati i iz školjkaša. Primarni izvor alohtonih bakterija za školjkaše jesu fekalno onečišćenje i otpadne vode (Krstulović i Šolić, 1997).

1.4.1. Porodica Enterococcaceae

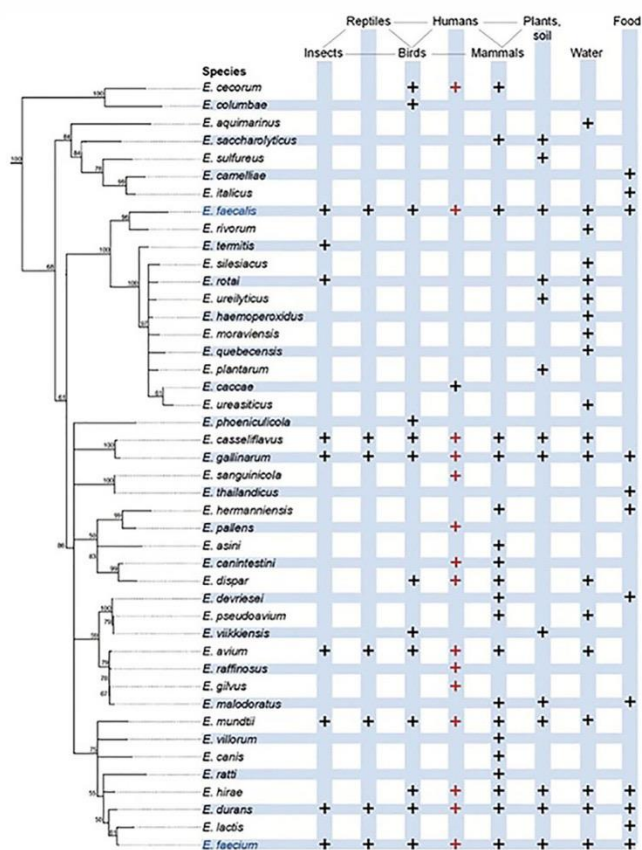
Porodicu Enterococcaceae obuhvaća 38 vrsta od kojih su sve Gram-pozitivni koki koji mogu biti spojeni u parove ili kratke lance. Fakultativno su anaerobi i katalaza negativni. Pripadaju zdravoj flori gastrointestinalnog i urogenitalnog sustava.

1.4.2. Enterococcus spp.

Enterokoki su bakterije fekalnog podrijetla i obično nastanjuju probavni trakt ljudi. Enterokoki su u stanju preživjeti stres i neprijateljsku okolinu, uključujući ekstremnu temperaturu (5 – 65 °C), pH (4,5 – 10,0) i visoku koncentraciju NaCl. Dugo su smatrani bezopasnima za ljude, a zbog toga što proizvode bakteriocine, tijekom prošlog stoljeća koristili su se u prehrambenoj industriji kao probiotici. Danas je njihova prisutnost u hrani pokazatelj fekalnog onečišćenja, a najčešće se izoliraju iz hrane iz mora. Posljednjih godina enterokoki su postali jedni od najčešćih bolničkih patogena, a zahvaljujući njihovoj otpornosti na glikopeptidne antibiotike postotak smrtnih slučajeva zaraženih osoba raste i do 61 % (Fisher i Phillips, 2009).

Tijekom zadnjih deset godina njihova se taksonomija znatno promijenila, tako da rod *Enterococcus* sada sadrži preko četrdeset vrsta (Slika 4). Ne postoje fenotipske osobitosti kojima bi se mogli razlikovati enterokoki od drugih Gram-pozitivnih, katalaza negativnih koki bakterija

pa identifikacija ide u obrnutom smjeru, tako da se prvo eliminiraju one koje imaju svojstva drugih vrsta (Fisher i Phillips, 2009).

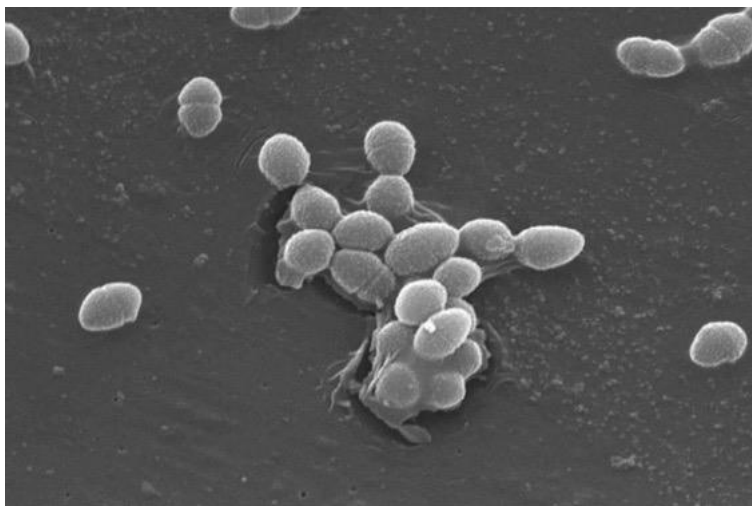


Slika 4. Vrste roda *Enterococcus* i njihova rasprostranjenost u prirodi (prema Lebreton i sur., 2014).

1.4.2.1. Crijevni enterokoki

Crijevni enterokoki primarno su nepatogene bakterije koje zajedno s koliformnim bakterijama čine fiziološku floru donjeg probavnog sustava u čovjeka i toplokrvnih životinja (Stilinović i Hrenović, 2009; Antolović i sur., 2016). Crijevni enterokoki koriste se kao pokazatelji higijenske kakvoće vode (Mote i sur., 2012). Ovu skupinu čine bakterije roda *Enterococcus* s ukupno 16 vrsta. Najvažnije među njima jesu *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* i *E. durans* koje se izlučuju fekalijama ljudi i toplokrvnih životinja (Slika 5). *E. casseliflavus* i *E. mundtii* nefekalne su vrste, ali mogu biti prisutne u vodi kao posljedica industrijskih otpadnih voda. Crijevni enterokoki jesu Gram-pozitivni, jajoliko izduženi koki, raspoređeni u parove i

kratke lance. Broj crijevnih enterokoka u pravilu pozitivno je vezan s brojnošću fekalnih i ukupnih koliformnih bakterija (*E. coli*). Njihova je sposobnost preživljavanja u okolišu bolja i dulje prežive u odnosu na koliformne bakterije, što je prednost u bakteriološkim analizama vode (Ashbolt i sur., 2001).



Slika 5. Predstavnik crijevnih eterokoka bakterija *Enterococcus faecalis*.

1.4.2.2. Enterokoki u okolišu

Enterokoki se koriste kao pokazatelji fekalnog onečišćenja u okolišu. Prijelaz iz životinjskog gastrointestinalnog trakta, koji je bogat hranjivim tvarima, u oligotrofni okoliš, koji je uglavnom siromašan hranjivim tvarima, izlaže enterokoke gladovanju.

Osim što se razne vrste enterokoka mogu pronaći na biljkama, mogu se pronaći i u vodenom okolišu. Enterokoki preživljavaju i u slanoj i u slatkoj vodi, ali nije sigurno razmnožavaju li se. U vodi, vrste *E. faecium* i *E. faecalis* fekalni su zagađivači, a izvor drugih vrsta manje je jasan.

Vrste enterokoka izolirane iz pijeska jesu *E. faecium*, *E. casseliflavus* i *E. durans*, a iz morskog sedimenta *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* i *E. mundtii* (Lebreton i sur., 2014).

Još uvijek nije jasno rastu li enterokoki kao slobodno živući organizmi u tlu, pijesku ili sedimentu, ali zna se da, za razliku od *E. coli*, enterokoki za rast zahtijevaju kompleksnije nutrijente (Lebreton i sur., 2014).

1.5. Školjkaši

Školjkaši pripadaju koljenu Mollusca, morfološki vrlo raznolikoj grupi unutar koje ima više od 90000 opisanih vrsta. Školjkaši su pretežito morske životinje, a u slatkim vodama slabo su zastupljene. Poznato je oko 20000 vrsta školjkaša. Neke vrste imaju iznimno velik ekonomski značaj, posebice sredozemna dagnja (*Mytilus galloprovincialis*) i europska plosnata kamenica (*Ostrea edulis*). Prilagođene su sesilnom ili polusesilnom načinu života, a veličinom variraju od nekoliko milimetara do nekoliko metara (Petrić, 2015).

Tijelo školjkaša spljošteno je te je obavijeno mekim plaštom koji izlučuje desnu i lijevu vapnenastu ljušturu, odnosno školjku. Ona može biti simetrična ili asimetrična, a dvije ljušture spaja ligament na leđnoj strani. Vrh ljušture ili umbo najstariji je dio ljušture koja u presjeku ima tri sloja: vanjski sloj izgrađen od konhiolina, ispod njega deblji prizmatični sloj od kalcijevog karbonata te unutrašnji sedefasti sloj.

Na rubovima plašta, čija je zadaća izlučivanje lijeve i desne ljušture, nalaze se dva otvora za ulaz i izlaz vode. Dorzalni, tj. gornji otvor izlazni je kanal koji služi izbacivanju vode i fekalija, a ventralni, tj. donji otvor služi za ulazak vode. Pokreću se antagonističkim djelovanjem ligamenta, te kontrakcijom i relaksacijom mišića aduktora (Petrić, 2015).

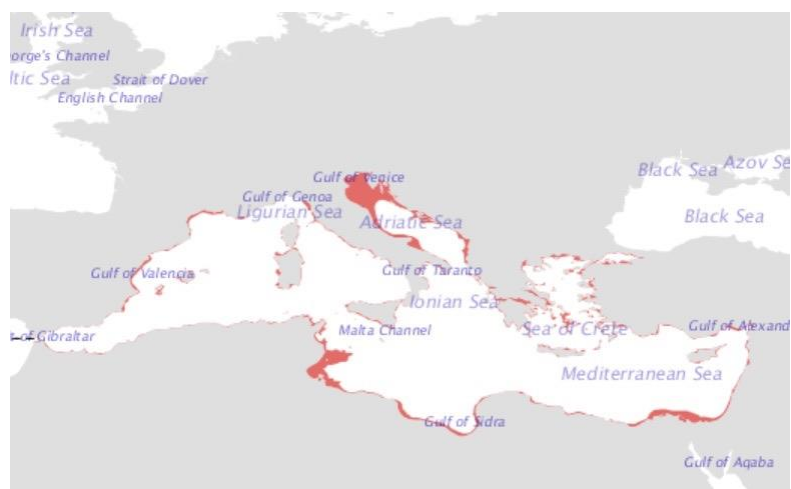
Škrge se sastoje od dva reda škržnih lamela oblika slova W smještenih ispod plašta. Duž ruba plašta raspoređena su osjetila kako bi organizam bio u stalnom dodiru s okolišem. Imaju jednostavno građene oči, a za ravnotežu im služe statociste. S donje strane tijela nalazi se stopalo koje služi za ukopavanje, a u njemu bisusna žlijezda koja izlučuje bisusne niti potrebne za pričvršćivanje na čvrstu podlogu.

Školjkaši se hrane filtracijom, tako da voda koja ulazi u plaštenu šupljinu struji preko škrge, čime životinja dobija hranjive čestice, a strujanje vode odvodi CO₂ (Habdija i sur., 2011).

Školjkaši su amniotelični, te za izlučivanje amonijaka koriste par metanefridija koji se nalazi ispod osrčja. Imaju otvoreni optjecajni sustav kojim kruži hemolimfa i uglavnom su razdvojena spola. Oplodnja je vanjska, ličinka kod morskih vrsta naziva se veliger i slična je trohofori, a slatkovodnim vrstama karakteristična je glohidija (Petrić, 2015).

1.5.1. Sredozemna dagnja – *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Mytilus galloprovincialis ili sredozemna dagnja jest školjkaš Sredozemnog mora (Slika 6). Točan raspon *M. galloprovincialis* nije poznat jer se često miješa s drugim vrlo sličnim vrstama roda *Mytilus*. U Europi se može pronaći svugdje gdje je čvrsti supstrat; na stjenovitim obalama, u zaklonjenim lukama i estuarijima u zonama plime i oseke, pa sve do 40 m dubine gdje živi pričvršćena bisusnim nitima.



Slika 6. Prikaz rasprostranjenosti *M. galloprovincialis* u Sredozemnom moru (izvor: <http://www.fao.org/fisheiry/species/3529/en>).

Hrani se fitoplanktonom i detritusom filtrirajući okolno more. Veličine ove vrste variraju u odnosu na biotope u kojem žive. Tako u područjima plime i oseke školjkaši uglavnom ostaju manji, rijetko prelazeći 6 cm, dok na većim dubinama dostižu veličine otprilike 10 cm (FAO, <http://www.fao.org/fisheiry/species/3529/en>).

Dagnje imaju karakterističnu ljušturu crne boje prošaranu nijansama plave, ljubičaste ili smeđe boje (CABI, 2018). Većinom su gonohoristi, ali postoji mogućnost hermafroditizma. Spolna žlijezda smještena je u plaštu pa se spol može lako odrediti otvaranjem ljuštura i temeljem razlike u boji muških i ženskih gonada. Ženske su gonade narančasto-crvene, a muške mlječne boje (Linardić, 2014) (Slika 7).



Slika 7. Slika unutrašnjosti dagnje na kojoj se u plaštu vide muške gonade mliječne boje označene narančastom strelicom.

Dagnje se mrijeste jednom ili više puta godišnje, ovisno o temperaturi i količini hrane u okolišu. Ovisno o veličini i plodnosti, dagnja prilikom mrijesta može izbaciti u okolinu 1 – 25 milijuna jajašaca. Embrij se razvija u veliger ličinku dva dana nakon oplodnje i u planktonskom obliku ostaje 10 – 20 dana. Nakon dosezanja dužine 250 – 300 μm , što traje otprilike četiri do osam tjedana, pričvrste se za podlogu bisusnim nitima (Linardić, 2014).

Prilikom filtracije vode čestice zaostaju na škržnim lamelama, odakle se cilijama prenose prema ustima (DAFF, 2012).

Zbog filtracije i svog načina života zbog kojeg ne mogu pobjeći od onečišćenja, dagnje se koriste za praćenje onečišćenja i njegova utjecaja na vodene organizme.

1.5.2. Praćenje kakvoće mora i školjkaša na uzgajalištima u Republici Hrvatskoj

Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske – Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane temeljem članka 3. stavka 1. Pravilnika o posebnim pravilima organizacije i provedbe službenih kontrola koje se provode na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša („Narodne novine“, broj 82/14), donosi Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša (Tolušić, 2017).

Jedno je od tih područja i Marinski zaljev. To je proizvodno područje na kojem se uzgajaju dagnje, koje su referentna vrsta za praćenje mikrobiološke kakvoće, biotoksina, metala, benzo(a)pirena i zbroj benzo(a)pirena, benzo(a)antracena, benzo(b)fluorantena i krizena, a Stipan

Jaz M1 (Φ 43°30'47.5"N λ 16°09'20.7"E) stalna je točka uzorkovanja za navedene pretrage (Tolušić, 2017) (Tablica 2).

Tablica 2. Parametri i plan uzorkovanja na uzgajalištu Stipan Jaz u Marinskom zaljevu (izvor: <http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/HranaZivPod/Plan%20pra%C4%87enja%20kakvo%20mora%20i%20%C5%A1koljka%C5%A1a%202017.pdf>).

a) morska voda	učestalost
fitoplanktonski sastav	od 1. 12. do 31. 3. svaka dva tjedna, od 1. 4. do 30. 11. tjedno
b) meso školjkaša	
Benzo(a)piren i zbroj benzo(a)pirena, benzo(a)antracena, benzo(b)fluorantena i krizena	polugodišnje (IV., X. mjesec)
metali (Cd, Hg, Pb)	polugodišnje (IV., X. mjesec)
<i>E. coli</i>	mjesečno (trećeg ponedjeljka u mjesecu)
biotoksini (PSP, DSP, ASP)	tjedno

1.6. Dosadašnja istraživanja

1.6.1. Prisutnost oocista *Cryptosporidium* spp. u dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i brbavice (*Venus verrucosa*) u Jadranskom moru

S obzirom na to da se školjkaši hrane filtrirajući more, izloženi su nakupljanju oocista *Cryptosporidium* spp. u svojim tkivima. U provedenom istraživanju na dagnjama iz uzgajališta Mali Ston u Jadranskom moru, jedinke su prikupljene tijekom godine dana s četiri različite lokacije te se prisutnost nametnika određivala imunoflorescencijom (Mladineo i sur., 2009). Ukupna godišnja prevalencija *Cryptosporidium* spp. iznosila je 16,8 %, što se podudaralo i s vjerojatnim brojem *E. coli* prisutnom u dagnji (Mladineo i sur., 2009).

Dvije godine kasnije provedeno je istraživanje na brbavici (*Venus verrucosa*) iz Kaštelanskog zaljeva. Brbavica ima visoku tržišnu vrijednost na Sredozemlju, posebice u Španjolskoj i Francuskoj, zbog čega je vrlo zanimljiva za akvakulturu, a samim time i za istraživanje (Mladineo i sur., 2011). Cilj istraživanja bio je procijeniti sezonsku distribuciju pripadnika dva roda Apicomplexa, *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp., koristeći imunofluorescenciju i lančanu reakciju polimerazom (polymerase chain reaction – PCR). Najveća

abundancija oocista *Cryptosporidium* spp. bila je u jesen (45/kg školjkaša), a kod *Giardia* spp. u zimskom razdoblju (556/kg školjkaša), ukazujući da je abundancija oocista *Giardie* 14 puta veća od *Cryptosporidiuma* (Mladineo i sur., 2011).

1.6.2. Preživljavanje enterokoknih bakterija u području bogatom nutrijentima

Epidemiološka istraživanja pokazala su da su crijevni enterokoki, prvenstveno oni dospjeli putem antropogenih izvora, postali vrlo bitni kao mikrobiološki pokazatelji zdravstvene ispravnosti morskih voda (Cabelli i sur., 1982; Kay i sur., 1994; Fleisher i sur., 1996; Kay i sur., 2004). Razumijevanje preživljavanja enterokoka u obalnim vodama vrlo je bitno za zaštitu zdravlja javnosti. Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization* – WHO) i Europska komisija (*European Commission*) predlažu modeliranje kojim bi na rekreacijskim mjestima izvršilo predviđanje kakvoće vode u stvarnom vremenu. Prethodni modeli imali su fokus na koliformnim bakterijama i pretpostavljali su dvije statične T90 dnevne i noćne vrijednosti za karakterizaciju procesa reduciranja, gdje T90 predstavlja vrijeme potrebno za redukciju 90 % bakterija.

Na preživljavanje enterokoka najviše djeluje primljena doza sunčevog zračenja. Prema Gamesonu i Gouldu (1985) te Sintonu i sur. (1994) valna duljina ispod 370 nm odgovorna je za više od polovice inaktivacije bakterija. U vodenom stupcu na količinu ozračenosti značajno utječe zamućenost suspendiranim materijalom, jer ograničava prodiranje svjetlosti, ali suspendirane čestice također mogu stvoriti sloj na površini bakterijskih stanica i tako ih štititi (Roper and Marshall, 1978). Osim sunčevog zračenja, i porast temperature mora kao značajnog abiotičkog čimbenika, povisuje stopu odumiranja enterokoka (Wilkinson, 2001). Mikrobiološke interakcije (npr. predacija) mogu biti od velikog značaja, ali ih je teško izmjeriti (Wilkinson, 2001).

1.7. Svrha i ciljevi rada

Ciljevi ovog rada su ispitati:

- prisutnost crijevnih enterokoka i nametnika *Cryptosporidium* spp. u dagnjama iz uzgoja izloženih dvodnevnom antropogenom zagađenju
- povezanost između koncentracije crijevnih enterokoka i nametnika *Cryptosporidium* spp. u dagnjama
- vrijeme potrebno za pročišćavanje crijevnih enterokoka i nametnika *Cryptosporidium* spp. iz dagnji postavljenih u pokusne bazene sa slobodnim protokom morske vode
- prikladnost crijevnih enterokoka kao pokazatelja učinkovitosti pročišćavanja školjkaša u odnosu na *Cryptosporidium* spp.

2. MATERIJALI I METODE

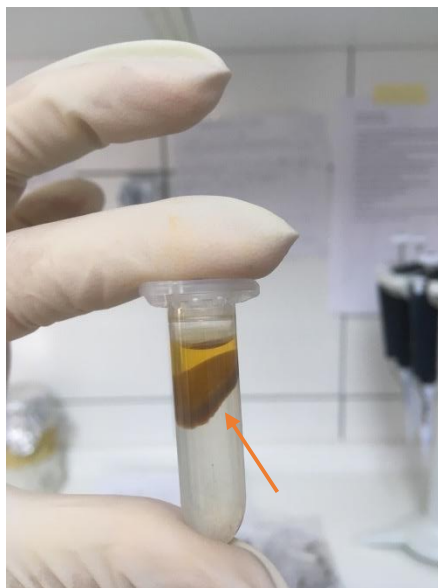
2.1. Uzorkovanje i priprema školjkaša za pretragu na *Cryptosporidium* spp.

Sredozemne dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) prikupljene su na uzgajalištu Stipan Jaz u Marini pokraj Trogira. Navedeno uzgajalište ima mikrobiološku kakvoću mora A (≤ 230 *E. coli*/100 g tkiva i međuljuštune tekućine). Nakon što su očišćene od obraštaja, dagnje su stavljene u mrežice pergolara i dva dana položene u more u blizini izvora mikrobiološkog onečišćenja u Kaštel Sućurcu na dubini od 1 m. Potom su na Institutu za oceanografiju i ribarstvo (IOR), u Laboratoriju za akvakulturu, nasumično pomiješane i podijeljene u tri jednake grupe (svaka se sastojala od tri podgrupe ili triplikata) za kasnija uzorkovanja po vremenskim točkama, osim prvih 30 komada koje su predstavljale uzorak nultog stanja. Podgrupe su stavljene u mrežaste vrećice vezane konopcem. Zatim su vrećice s dagnjama obješene u bazene sa stalnim protokom svježije morske vode koja se crpi s dubine od 15 m ispred IOR-a. Svaki triplikat od iste grupe dagnji smješten je u isti bazen (Slika 8). Na taj je način omogućeno pročišćavanje dagnji u tri replike pri istim uvjetima. Poduzorci dagnji (po jedna vrećica s 30 jedinki) iz svakog od tri bazena uzimani su u vremenskim razmacima od 12, 24 i 48 nakon početka pročišćavanja.



Slika 8. Postavljanje vrećica s dagnjama, donesenim iz mora pod utjecajem antropogenog onečišćenja, na pročišćavanje u bazen sa slobodnim protokom vode na Institutu za oceanografiju i ribarstvo (IOR) Split.

Uzorci su imenovani tako da naziv uzorka uključuje tkivo uzorkovanja (Š – škrge, P – plašt), vrijeme uzorkovanja (0, 12, 24 ili 48 h) i broj dagnje u poduzorku (1 – 30). U svrhu analize pojavnosti *Cryptosporidium parvum* izvađene su škrge i plaševi nultog uzoraka 30 dagnji, koje su bile pod izravnim djelovanjem antropogenog utjecaja prije postavljanja na pročišćavanje (oznaka 0 h Š 1 – 30 i 0 h P 1 – 30). Preostalih 90 dagnji postavljenih u bazen za purifikaciju (po 30 dagnji u tri različita bazena za tri vremenske točke uzorkovanja) uzorkovano je nakon 12, 24 i 48 h od početka purifikacije (oznake 12 h Š 1 – 30 i 12 h P 1 – 30, 24 h Š 1 – 30 i 24 h P 1 – 30 te 48 h Š 1 – 30 i 48 h P 1 – 30). Zbog korištenja dietil etera tijekom homogenizacije postupak je odrađen u kemijskom digestoru. Svi uzorci stavljeni su u 5 ml tubicu s 1 ml fosfatnog pufera (phosphate buffered saline, PBS), nakon čega je tkivo homogenizirano. Škrge i plašt homogenizirani su uz pomoć štapnog homogenizatora (Ultraturax), 4 x 30 sekundi sa stankama između homogeniziranja. Između uzoraka štap štapnog homogenizatora očišćen je alkoholom i destiliranom vodom kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka. U tubice s homogenatom škrge i plašta dodan je 1 ml dietil etera. Te su tubice dobro vorteksirane, minimalno 30 sekundi. Tubice s vorteksiranim homogenatom, centrifugirane su 10 min/ 1250 rpm, nakon čega je bio vidljiv prsten homogenata škrge, odnosno plašta (Slika 9).



Slika 9. Prsten homogenata plašta nakon centrifugiranja (narančasta strelica).

Supernatant je odpipetiran, a prstenovi su pohranjeni u 2 ml tubice u koje je dodan PBS, nakon čega su vorteksirane kako bi se talog što bolje isprao. Uzorci su potom centrifugirani 2 min/ 13000 rpm nakon čega se u tubicama stvorio novi prsten i talog na dnu. Prsten je ponovno izvađen i pohranjen u novu tubicu s 1 ml PBS-a radi ispiranja, te je uzorak vorteksiran i centrifugiran još 5 min/ 10000 rpm. Prethodni se korak ponovio još tri puta radi ispiranja taloga.

Protokol za obradu tkiva školjkaša za pretragu na *Cryptosporidium* spp.:

1. Svaki skupni uzorak (pool) homogenizirati u 1 ml PBS-a koristeći Ultraturax (4 pulsa od 30 s, dodatno ako treba)
2. Dodati jednak volumen dietil etera i dobro vorteksirati, najmanje 30 s
3. Centrifugiranje 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. Centrifugiranje 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, vorteksirati da se prsten dobro ispere, centrifugirati 5 min, 10000 rpm
10. Ponoviti prethodni korak još tri puta te nastaviti s izolacijom DNA (u lizirajućem puferu)
11. Ovisno kada će se nastaviti s izolacijom DNA u uzorke dodati 96-postotni etilni alkohol kako bi što duže mogli stajati na sobnoj temperaturi.

2.2. Molekularna analiza *Cryptosporidium* spp. u tkivu školjkaša

2.2.1. Izolacija DNA iz homogenata škrge i plašta sredozemne dagnje

Iz uzorka se uklonio PBS te se plastičnim štapićem usitnio prsten (talog) u tubici, zatim je dodano 200 µl lizirajućeg pufera i 2 µl proteinaze K (20 mg/ml). Tubice su vorteksirane i kratko centrifugirane te postavljene u termomikser (Eppendorf, Biosan) na digestiju preko noći kako bi se tkivo raspalo. Digestija se odvijala pri temperaturi od 55 °C i trešnji od 550 rpm-a. Sutradan ujutro dodano je novih 2 µl proteinaze K te je digestija nastavljena još dva sata. Nakon digestije tubice su vorteksirane i centrifugirane 10 min/ 13000 rpm. Uzorak u tubicama razdvojio se na

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 kao i lizirajućeg pufera, uzorak je vorteksiran kako bi se faze izmiješale i centrifugiran 10 min/ 13000 rpm. U tubicama se opet stvorio talog i supernatant: ovaj potonji se pažljivo odpipetirao kako bi se sačuvao talog u kojem je DNA. U tubice je dodano 800 µl 70-postotnog etilnog alkohola (EtOH), uz okretanje gore-dolje nekoliko puta kako bi se DNA isprala. Uzorci su centrifugirani 10 min/ 12000 rpm, supernatant je odpipetiran te su tubice ostavljene otvorene 20-ak min kako bi se talozi DNA osušili na zraku. Nakon sušenja u tubice je dodan TE pufer (100 µl – 200 µl, ovisno o veličini taloga) kako bi se talog otopio.

Protokol za izolaciju DNA:

1. U tubicu s prstenom dodati 200 µl lizirajućeg pufera
2. Dodati 2 µl proteinaze K (po potrebi dodati još 2 µl, 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 (dodavanje još 2 µl proteinaze K ujutro po potrebi, ovisno o tkivu)
5. Vorteks, centrifuga 10 min, 13000 rpm
6. Premjestiti supernatant (u kojemu je DNA) u čistu tubicu (paziti da se ne pokupi talog), po potrebi ponovno centrifugirati (7 – 8 min, 13000 rpm) te ispipetirati preostali supernatant
7. Dodati 1 volumen izopropanolnog alkohola (na 200 µl lizirajućeg pufera dodati 200 µl izopropanolnog alkohola koji obara DNA na dno)
8. Vorteksirati da bi se izmiješale faze
9. Centrifuga 10 min, 13000 rpm
10. Supernatant prvo izliti, a zatim ostatak pažljivo odpipetirati pazeći da se ne dotakne talog (u kojemu je DNA)
11. Nadodati 800 µl 70-postotnog etilnog alkohola, izmiješati okrećući tubicu 5 – 6 puta (ispiranje DNA)
12. Centrifuga 10 min, 12000 rpm
13. Supernatant prvo izliti, a zatim ostatak pažljivo odpipetirati pazeći da se ne dotakne talog (u kojemu je DNA)

14. Ostaviti 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).

2.2.2. *Određivanje koncentracije i čistoće izolirane DNA*

Uzorcima s izoliranom DNA potrebno je odrediti koncentraciju i čistoću pomoću spektrofotometra (Genova Nano) mjerenjem omjera absorbancije na valnoj duljini 260/280, koja se očitava radi određivanja kontaminacije DNA s proteinima (optimum za DNA je 1,8) i na valnoj duljini 260/230, koja se očitava radi određivanja kontaminacije DNA fenol-kloroform-izoamil-alkoholom ili drugim aromatskim spojevima (optimum za DNA je iznad 1,8). Prije očitavanja instrument je baždaren dodavanjem 1 μ l TE pufera. Kada je spektrofotometar baždaren, na izvor zračenja dodan je 1 μ l izolirane DNA otopljene u TE puferu. Između uzoraka, kako ne bi došlo do njihova miješanja, potrebno je papirom lagano obrisati mjesto (izvor zračenja) gdje je stavljena kapljica uzorka. Uzorcima kojima je očitana visoka koncentracija, postepeno je dodavano još TE pufera u tubicu s otopljenom DNA kako bi se koncentracija smanjila (Tablice 3 – 10).

Tablica 3. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 0 h Š 1 – 30

(* nema uzorka).

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	60 μ l	> 9999	860 μ l	311,1	2,010	2,099
2.	60 μ l	609,9	260 μ l	249,4	1,943	1,590
3.	60 μ l	> 9999	660 μ l	318,7	2,010	2,075

4.	100 µl	852	280 µl	313,5	1,978	1,528
5.	60 µl	> 9999	1160 µl	342,6	1,993	2,113
6.	60 µl	1949	460 µl	333,1	1,967	1,870
7.	60 µl	2216	860 µl	333,8	1,974	2,039
8.	60 µl	1308	460 µl	312,4	2,068	2,176
9.	60 µl	> 9999	1060 µl	365,8	2,004	2,079
10.	60 µl	1908	460 µl	331	2,003	2,033
11.	*					
12.	60 µl	2172	760 µl	342,1	1,989	2,199
13.	80 µl	> 9999	480µl	370,2	1,888	1,592
14.	60 µl	> 9999	860 µl	333,6	1,963	1,979
15.	60 µl	1190	360 µl	341	1,967	2,048
16.	80 µl	1696	480 µl	270,6	1,948	2,068
17.	80 µl	2432	480 µl	314,9	1,514	1,402
18.	60 µl	> 9999	860 µl	351,7	2,081	2,125
19.	60 µl	> 9999	1160 µl	367,9	1,997	2,097
20.	80 µl	1200	480 µl	316,3	2,056	2,171
21.	80 µl	2332	580 µl	352,1	1,941	2,067

22.	100 µl	> 9999	850 µl	335,7	1,961	1,899
23.	80 µl	1130	480 µl	288,4	2,051	2,126
24.	60 µl	> 9999	1360 µl	434,6	1,978	2,072
25.	60 µl	1537	460 µl	251,2	1,896	1,936
26.	60 µl	1539	460 µl	376,8	1,982	2,125
27.	80 µl	672,4	260µl	390,2	1,912	1,990
28.	60 µl	803,9	260 µl	314,7	1,998	2,002
29.	80 µl	1572	460 µl	336,1	1,913	1,852
30.	60 µl	> 9999	660 µl	345,6	2,001	2,045

Tablica 4. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 0 h P 1 – 30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	80 µl	> 9999	1080 µl	309	1,875	1,394
2.	160 µl	1930	1160 µl	301,2	1,882	1,409
3.	180 µl	2092	1180 µl	322,1	1,923	1,593
4.	180 µl	1294	780 µl	331,9	1,916	1,523
5.	80 µl	> 9999	880 µl	313,6	1,974	1,905

6.	80 µl	> 9999	1480 µl	391	1,908	2,207
7.	80 µl	> 9999	680 µl	351,5	1,930	2,006
8.	80 µl	1054	280 µl	308,7	1,958	1,590
9.	160 µl	> 9999	1560 µl	543,2	1,900	2,295
10.	80 µl	2509	680 µl	358,8	1,974	2,008
11.	80 µl	> 9999	1480 µl	384,9	1,952	2,123
12.	80 µl	1728	480 µl	295,8	1,894	1,692
13.	80 µl	1136	280µl	328	2,014	1,758
14.	80 µl	> 9999	880 µl	356,6	1,963	1,704
15.	180 µl	1908	1080 µl	314	1,968	1,740
16.	80 µl	> 9999	1080 µl	364,3	1,945	2,245
17.	80 µl	2452	880 µl	25,32	1,972	2,004
18.	80 µl	1415	480 µl	249,6	1,980	1,851
19.	80 µl	1759	480 µl	316	1,988	1,714
20.	80 µl	> 9999	1480 µl	589,5	1,929	2,085
21.	80 µl	> 9999	680 µl	29,48	1,957	2,224
22.	80 µl	1385	300 µl	366,8	2,009	1,844
23.	80 µl	1515	680 µl	285,3	2,017	2,049

24.	80 µl	1814	680 µl	304,8	1,960	2,008
25.	80 µl	1568	480 µl	293	2,012	2,027
26.	80 µl	> 9999	1280 µl	333,9	1,965	1,789
27.	80 µl	> 9999	480µl	22,44	1,957	1,791
28.	80 µl	892,9	280 µl	249,5	1,909	1,360
29.	80 µl	> 9999	880 µl	350,4	1,942	2,021
30.	80 µl	> 9999	1480 µl	420,4	1,927	2,211

Tablica 5. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 12 h Š 1 – 30

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	100 µl	2108	100 µl	256,4	1,960	1,373
2.	100 µl	1930	900 µl	291,1	2,094	2,150
3.	100 µl	> 9999	1300 µl	356,8	2,057	2,176
4.	100 µl	1251	700 µl	236,8	1,960	1,406
5.	100 µl	1892	900 µl	313,9	2,075	2,133
6.	60 µl	> 9999	660 µl	349,1	2,038	2,175
7.	100 µl	1538	700 µl	301	2,048	2,161

8.	300 µl	914,5	1100 µl	324,4	2,040	2,144
9.	100 µl	843,2	500 µl	272,9	1,938	1,287
10.	60 µl	2280	660 µl	266,8	2,007	1,968
11.	100 µl	1781	700 µl	341,7	1,984	1,842
12.	60 µl	> 9999	1060 µl	338,1	1,967	1,880
13.	100 µl	2282	900 µl	336,6	2,046	2,076
14.	100 µl	2176	900 µl	296,9	2,011	2,035
15.	100 µl	1621	700 µl	289,1	2,051	2,038
16.	100 µl	1825	500 µl	311,4	1,960	1,293
17.	100 µl	1901	1100 µl	207,9	2,052	2,103
18.	100 µl	1776	700 µl	320	2,080	2,119
19.	100 µl	1896	700 µl	307,9	2,061	2,049
20.	100 µl	1492	700 µl	268,9	2,039	1,759
21.	100 µl	1928	700 µl	327,4	1,956	1,474
22.	100 µl	2148	700 µl	251,5	2,010	2,090
23.	100 µl	1757	700 µl	291,8	2,020	1,976
24.	100 µl	1656	700 µl	266,6	2,067	2,130
25.	100 µl	2091	900 µl	271,5	2,096	2,149

26.	100 µl	> 9999	1100 µl	306,2	2,055	2,137
27.	60 µl	> 9999	1060µl	305,7	1,986	2,091
28.	60 µl	> 9999	660 µl	349,9	2,046	2,131
29.	100 µl	1060	500 µl	225,8	2,027	2,097
30.	100 µl	1018	900 µl	324,1	1,954	2,337

Tablica 6. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 12 h P1 – 30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	100 µl	1023	500 µl	195,7	1,942	1,486
2.	100 µl	1299	500 µl	279,3	2,026	1,939
3.	100 µl	1297	500 µl	268,8	2,018	1,948
4.	100 µl	> 9999	1700 µl	379,4	1,912	2,272
5.	100 µl	1137	500 µl	256,6	1,915	1,634
6.	100 µl	1837	900 µl	306,4	1,943	2,137
7.	100 µl	1696	500 µl	351,6	1,980	1,694
8.	100 µl	> 9999	1700 µl	339,6	1,954	2,070
9.	100 µl	1422	500 µl	323	1,957	1,996

10.	100 µl	1801	500 µl	280,6	1,995	1,791
11.	100 µl	1482	500 µl	328,9	1,953	1,862
12.	100 µl	> 9999	1700 µl	328	1,923	2,180
13.	100 µl	> 9999	900 µl	308,5	1,965	1,592
14.	100 µl	870,8	500 µl	186,8	1,915	1,288
15.	100 µl	549,2	500 µl	109,1	1,944	1,819
16.	100 µl	1747	500 µl	382,2	1,975	1,878
17.	100 µl	2024	900 µl	244,1	2,010	1,850
18.	100 µl	> 9999	1700 µl	392,8	1,950	2,170
19.	100 µl	1692	500 µl	369,8	2,009	2,081
20.	100 µl	> 9999	1700 µl	490,8	1,911	2,290
21.	100 µl	1095	500 µl	207,4	1,981	1,957
22.	100 µl	1732	900 µl	197,4	1,892	2,017
23.	100 µl	1416	500 µl	304,5	1,984	1,678
24.	100 µl	> 9999	1700 µl	311,1	1,947	1,996
25.	100 µl	1063	500 µl	204,6	1,676	0,687
26.	100 µl	1218	500 µl	256,3	1,915	1,927
27.	100 µl	2377	900µl	292,7	2,033	2,184

28.	100 µl	888	500 µl	114,8	2,002	1,172
29.	100 µl	1436	500 µl	305,7	2,007	2,317
30.	100 µl	1059	500 µl	209,5	2,023	1,780

Tablica 7. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 24 h Š 1 – 30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	100 µl	1568	900 µl	213,1	2,023	2,124
2.	100 µl	> 9999	900 µl	359,4	1,981	2,205
3.	100 µl	995,6	500 µl	243,1	1,971	1,551
4.	100 µl	> 9999	900 µl	350	1,993	2,251
5.	100 µl	1422	500 µl	340,1	1,952	1,646
6.	100 µl	> 9999	1300 µl	262,5	2,004	2,155
7.	100 µl	969,6	900 µl	136,1	1,877	1,351
8.	100 µl	1781	900 µl	248,5	1,972	1,722
9.	100 µl	> 9999	1300 µl	260,9	1,982	2,205
10.	100 µl	906	500 µl	194	1,891	1,642
11.	100 µl	> 9999	1300 µl	279,8	1,960	1,992

12.	100 µl	2079	900 µl	283,4	2,017	2,142
13.	100 µl	1906	900 µl	258,9	1,974	2,003
14.	100 µl	163,6	100 µl	163,6	1,984	1,902
15.	100 µl	1131	500 µl	357,4	1,976	2,079
16.	100 µl	2094	900 µl	268,3	1,978	2,156
17.	100 µl	1100	900 µl	226,6	1,991	2,223
18.	100 µl	1349	900 µl	280,4	1,978	2,132
19.	100 µl	1741	1300 µl	266,2	1,976	2,118
20.	100 µl	1151	900 µl	238,7	1,979	2,246
21.	100 µl	810,2	900 µl	169	1,909	2,000
22.	100 µl	985,7	500 µl	336,6	2,019	2,085
23.	100 µl	740,7	500 µl	246,2	1,901	1,431
24.	100 µl	1601	900 µl	301,4	1,940	2,074
25.	100 µl	1224	900 µl	254	2,013	2,229
26.	100 µl	1273	900 µl	258,1	2,002	2,198
27.	100 µl	1390	900µl	267,5	1,950	2,003
28.	100 µl	1502	900 µl	300	1,982	2,221
29.	100 µl	331,6	100 µl	331,6	1,961	1,816

30.	100 µl	1072	900 µl	218,1	1,982	2,155
-----	--------	------	--------	-------	-------	-------

Tablica 8. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 24 h P 1 – 30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	200 µl	1110	1100 µl	188,5	1,906	1,643
2.	200 µl	384,5	650 µl	45,81	1,913	1,448
3.	200 µl	424,3	650 µl	122,8	1,932	1,196
4.	200 µl	1673	1100 µl	275,1	1,922	2,149
5.	200 µl	625,5	650 µl	178,6	1,996	1,727
6.	200 µl	2339	1550 µl	316,1	1,887	2,183
7.	200 µl	572,8	650 µl	155,8	2,024	1,904
8.	200 µl	432,7	650 µl	98,12	1,934	1,315
9.	200 µl	324,5	200 µl	324,5	1,905	1,176
10.	200 µl	1366	650 µl	255,1	1,995	2,431
11.	200 µl	409,7	650 µl	108,4	1,866	1,255
12.	200 µl	1071	650 µl	306,9	1,885	1,304
13.	200 µl	979,2	1100 µl	348,1	1,884	2,126

14.	200 µl	> 9999	1750 µl	411,4	1,883	2,160
15.	200 µl	577,4	650 µl	91,22	1,895	1,177
16.	200 µl	505,1	650 µl	142,8	1,897	1,365
17.	200 µl	703,4	650 µl	198,7	1,983	1,849
18.	200 µl	> 9999	1750 µl	428,8	1,848	2,682
19.	200 µl	733,9	1100 µl	122,1	1,936	1,794
20.	200 µl	> 9999	1550 µl	347,6	1,899	1,956
21.	200 µl	2389	1550 µl	323,6	1,917	1,906
22.	200 µl	456,2	650 µl	126,8	1,869	1,165
23.	200 µl	1749	1100 µl	297,6	1,845	2,151
24.	200 µl	748,1	1100 µl	94,45	1,896	1,736
25.	200 µl	1198	650 µl	269,9	1,885	1,451
26.	200 µl	100,8	200 µl	100,8	1,816	1,416
27.	200 µl	1098	1550µl	271	1,840	2,275
28.	200 µl	819	650 µl	236,3	1,991	1,945
29.	200 µl	272,9	650 µl	272,9	1,893	1,235
30.	200 µl	985,6	1750 µl	363,9	1,905	1,955

Tablica 9. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 48 h Š 1 – 30.

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	100 µl	1498	900 µl	320,3	1,970	2,123
2.	100 µl	1188	500 µl	240,5	1,948	1,751
3.	100 µl	1150	900 µl	244,3	1,936	2,025
4.	100 µl	1364	900 µl	292,5	1,982	2,140
5.	100 µl	955,4	500 µl	325,4	1,951	2,171
6.	100 µl	1001	900 µl	249	1,958	1,940
7.	100 µl	1146	900 µl	236	1,968	2,085
8.	100 µl	1557	90 µl	306,8	1,964	2,174
9.	100 µl	1567	900 µl	324,5	1,961	2,135
10.	100 µl	820	500 µl	232,9	1,948	2,067
11.	100 µl	863,8	500 µl	287,4	1,936	2,093
12.	100 µl	997,7	500 µl	323,5	1,962	1,888
13.	100 µl	1216	900 µl	250,2	1,957	2,139
14.	100 µl	1050	900 µl	218,9	1,957	2,152
15.	100 µl	1583	900 µl	308,2	1,973	2,158
16.	100 µl	1389	900 µl	272	1,971	2,075

17.	100 µl	903,6	500 µl	284,8	1,941	2,063
18.	100 µl	766,6	500 µl	238,3	1,955	1,865
19.	100 µl	1080	900 µl	218,5	1,938	2,186
20.	100 µl	1732	1300 µl	261,6	1,936	2,061
21.	100 µl	1038	500 µl	335,6	1,643	1,259
22.	100 µl	1431	900 µl	260,8	1,978	2,202
23.	100 µl	1295	900 µl	256,7	1,982	2,167
24.	100 µl	895,7	500 µl	293,2	1,943	2,053
25.	100 µl	1198	1300 µl	259,5	1,938	2,098
26.	100 µl	1235	900 µl	264,2	1,950	2,029
27.	200 µl	1417	900µl	302	2,003	2,159
28.	200 µl	834,7	500 µl	285	1,917	1,813
29.	200 µl	850,5	500 µl	348,4	1,949	1,993
30.	200 µl	1773	1300 µl	280,2	1,942	1,966

Tablica 10. Prikaz početne i konačne koncentracije DNA te čistoće DNA za uzorke 48 h P 1 – 30

Broj uzorka	Početni volumen TE pufera u kojem je otopljena DNA	Početna koncentracija DNA	Konačni volumen dodanog TE pufera	Konačna koncentracija DNA	Čistoća DNA 260/280	Čistoća DNA 260/230
1.	200 µl	1516	1000 µl	338,6	1,922	1,505
2.	200 µl	553,8	600 µl	232	1,943	1,334
3.	200 µl	> 9999	1400 µl	450,5	1,872	2,028
4.	200 µl	1847	1400 µl	307,1	1,875	1,574
5.	200 µl	2479	1400 µl	366	1,924	1,919
6.	200 µl	1756	1400 µl	296,3	1,893	1,507
7.	200 µl	955,2	600 µl	309,2	1,924	2,157
8.	200 µl	724,5	900 µl	389,1	1,864	2,126
9.	200 µl	1398	900 µl	329,4	1,966	1,899
10.	200 µl	1882	1400 µl	280,7	1,892	1,584
11.	200 µl	1650	900 µl	331,8	1,917	1,601
12.	200 µl	541,1	600 µl	179,8	1,818	1,354
13.	200 µl	1730	900 µl	319,1	1,985	1,890
14.	200 µl	1525	900 µl	285,9	1,932	1,729
15.	200 µl	> 9999	1400 µl	501,3	1,862	2,358
16.	200 µl	1687	1400 µl	261,7	1,641	1,177

17.	200 µl	1456	900 µl	337,6	1,883	1,425
18.	200 µl	1126	900 µl	249,3	1,928	1,547
19.	200 µl	1827	1400 µl	522,7	1,887	2,021
20.	200 µl	718,9	600 µl	241,4	1,971	1,803
21.	200 µl	1424	1000 µl	328,2	1,886	1,504
22.	200 µl	> 9999	1400 µl	535,2	1,904	2,218
23.	200 µl	988,7	600 µl	295,4	1,983	1,871
24.	200 µl	2257	1400 µl	278,2	1,894	1,626
25.	200 µl	1849	1400 µl	286,2	1,847	1,395
26.	200 µl	1105	1000 µl	229,3	1,883	2,094
27.	200 µl	1056	1000µl	229,7	1,907	1,640
28.	200 µl	1321	1000 µl	288,9	1,848	1,245
29.	200 µl	1985	1400 µl	318,6	1,899	1,569
30.	200 µl	1295	1400 µl	344,4	1,850	2,326

2.2.3. Ugnježdjena lančana reakcija polimerazom DNA uzoraka

Ugnježdjena lančana reakcija polimerazom ili nested PCR (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) jest modificirani PCR čija je svrha poboljšanje osjetljivosti i specifičnosti reakcije. Nested PCR se sastoji od dva seta početnica i dvije uzastopne PCR reakcije. Prvi set početnica vezuje se na sekvence uzvodno od drugog seta početnica i koristi se u prvoj PCR reakciji. Amplikoni koji

su rezultat prve PCR reakcije koriste se kao predložak za drugi set početnica i za drugi korak amplifikacije. Zbog dodatne manipulacije amplikona povećava se mogućnost od prenošenja kontaminacije među uzorcima i reakcijama. Kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije, bilo bi poželjno prostorno razdvojiti ta dva koraka amplifikacije.

Nakon iščitavanja koncentracije i čistoće, pripremljena je osnovna mješavina za prvu Nested PCR reakciju (1° PCR 1,5 mM MgCl₂ mix) prateći protokol „*Cryptosporidium* typing using SSU gene PCR (nested PCR)“, autorice Kristin Elwin. Za pripremu reakcijske smjese korišten je Qiagenov kit za PCR koji sadrži: H₂O, 10 x pufer, MgCl₂, dNTP i HotStartTaq DNA polimerazu, te Sigma početnice: Cy 18s1F i Cy 18s1R (Tablica 11). Pripremljena smjesa (Tablica 12.) razdijeljena je u 56 tubica za PCR, po 24 µl u svaku. U 55 tubica s reakcijskom smjesom dodan je 1 µl prethodno izolirane DNA, a u dvije tubice stavljena je pozitivnu kontrola tj. referentna DNA *Cryptosporidium parvum* (Cp 11) dobivenu iz laboratorija *Public Health Wales Microbiology Division*, UK, kao i specifične početnice. Pozitivna kontrola stavljena je kako bi potvrdili da je svaki PCR uspješno izveden, odnosno da negativan rezultat ne predstavlja grešku u postupku.

Tablica 11. Slijed početnica korištenih u prvoj Nested PCR reakciji.

Naziv početnica	Slijed početnica u smjeru 5' →3'
Cy 18s1F	TTCTAGAGCTAATACATGCG
Cy 18s1R	CCCATTTCTTCGAAACAGGA

Tablica 12. Sastojci reakcijske smjese za prvu nested PCR reakciju.

1° PCR 1,5 mM MgCl ₂ MIX

Qiagen 1,5 Mm MgCl ₂	1 x (25 µl)
H ₂ O	19,87 µl
10 x 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 reakcijskom smjesom kratko su vorteksirane i centrifugirane kako bi se smjesa i DNA izmiješali, a zatim su postavljene u PCR uređaj, tj. termocikler (Bio – Rad), te je pokrenuta PCR reakcija prateći odgovarajući profil (Tablica 13.).

Tablica 13. PCR profil za prvu nested PCR reakciju u termocikleru.

1° PCR profil		
Temperatura (°C)	Vrijeme trajanja	Broj ciklusa
95 °C	15 min	1 x
94 °C	30 s	35 x
60 °C	30 s	35 x

72 °C	1 min	35 x
72 °C	10 min	1 x
20 °C	∞	

Dvadesetak minuta prije završetka prve nested PCR reakcije pripremljena je reakcijska smjesa za drugu PCR reakciju (2° PCR 3,5 mM MgCl₂ mix) (Tablica 15.). Korišten je isti Qiagenov kit (H₂O, 10 x pufer, MgCl₂, dNTP i HotStartTaq DNA polimerazu) kao za prethodnu reakciju, samo što je ovaj put u reakcijsku smjesu dodano ukupno 3,5 mM MgCl₂, te je korišten drugi par Sigma početnica; Cy 18s2F i Cy18sJR2 (Tablica 14). Reakcijska smjesa razdijeljena je u 56 PCR tubica te je u njih dodan 1 µl PCR produkta iz prethodnog PCR-a.

Tablica 14. Slijed početnica korištenih u drugoj PCR reakciji.

Naziv početnica	Slijed početnica u smjeru 5' →3'
Cy 18s2F	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG
Cy18sJR2	CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA

Tablica 15. Sastojci reakcijske smjese za drugu PCR reakciju.

2° PCR 3,5 mM MgCl ₂ MIX	
Qiagen 3,5 Mm MgCl ₂	1 x (25 µl)
H ₂ O	17,87 µl
10 x pufer (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl

MgCl ₂ (25mM)	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 reakcijskom smjesom, kao i prije, kratko su voretksirane, centrifugirane i stavljene u PCR uređaj te je pokrenuta druga PCR reakcija prateći dgovarajući profil (Tablica 16).

Tablica 16. PCR profil za drugu reakciju u termocikleru.

2° PCR profil		
Temperatura (°C)	Vrijeme trajanja	Broj ciklusa
95 °C	15 min	1 x
94 °C	30 s	35 x
62 °C	30 s	35 x
72 °C	1 min	35 x
72 °C	10 min	1 x
20 °C	∞	

2.2.4. Gel elektroforeza

Elektroforeza je metoda koja se koristi u molekularnoj biologiji kako bi se razdvojili fragmenti DNA molekula i kako bi se utvrdile veličine razdvojenih fragmenata. Zasniva se na procesu gdje otopljena tvar ili čestica efektivnog naboja putuje pod djelovanjem električnog polja po viskoznom puferu. Čestica putuje prema jednoj od elektroda, ovisno o njenom naboju. Jednako tako DNA putuje od negativne k pozitivnoj elektrodi zbog svog negativnog naboja, pri čemu manji fragmenti prolaze brže kroz pufer, a veći fragmenti sporije. 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 se gel koristi za uzorke veličine molekula od 10 – 50 000 bp (Dončević, 2017).

Za gel elektroforezu pripremljen je 1-postotni agarozni gel za koji je potrebno 0,5 g agaroze i 50 ml 0,5 x Tris-Acetat-EDTA (TAE) pufera. Kako bi se agarozna otopila, tikvica se zagrijavala u mirkovalnoj pećnici 1 – 2 minute. Nastao je tekući agarozni gel koji je hlađen vodom kako bi postao mlak, te je zatim u tikvicu dodana DNA interkalirajuća boja syber safe (Invitrogen). Sybr safe boja osjetljiva je na svjetlo, stoga se postupak izvodio u zatamnjenoj prostoriji kako bi se spriječilo da boja bude izložena neposrednom izvoru svjetla. Otopina iz tikvice potom je izlivena u kadicu koja je prethodno oblijepljena ljepljivom trakom, da se otopina ne izlije van. U kadicu su stavljena dva reda češljica koji su po zgušnjavanju otopine i izvlačenju iz stvrdnutog gela, ostavili u gelu jažice (32 jažice, 16 prvi red i 16 drugi red), u koje su zatim dodani PCR produkti pomiješani s bojom. Kadica je prekrivena kutijom i ostavljena u mraku 15 – 20 min kako bi se otopina dodatno zgusnula i napravila gel. Kada se gel napravio s rubova kadice skinuti su traka i češljici te je kadica s gelom uronjena u veću kadicu za gel elektroforezu s TAE 0,5 x puferom, a koja je spojena na električni uređaj koji u kadici tvori električno polje. Dok se gel stvrdnjavao, na parafilmu zalijepljenom na radnu površinu pipetom je pripremljeno 56 kapljica boje (6 x DNA Loading Dye) po 1 μ l. Svaka kapljica boje pomiješana je s 4 μ l PCR produkta druge PCR

reakcije, mijenjajući nastavke pipete između svakog uzorka. Prva jažica u oba reda ostavljena je prazna kako bi se u nju dodala 3,5 µl DNA velićinskog biljega (Gel pilot 100 bp plus loader) nakon što su napunjene ostale jažice. Kada su se sve jažice napunile, uključen je uređaj za elektroforezu kako bi struja tekla (od negativnog prema pozitivnom naboju) strujnim poljem jakosti 100 V kroz 35 min. Kadica se prekrila kutijom zbog osjetljivosti sybr safe boje koja se nalazi u gelu. Nakon 35 min električni je uređaj zaustavio protok struje kroz električno polje i time je završena elektroforeza. Gel je izvađen iz kadice za elektroforezu i stavljen na UV transiluminacijski uređaj (Vilber Lourmat) kako bi rezultati bili vidljivi.

Priprema gela:

1. Izvagati 0,5 g agaroze, istresti u tikvicu
2. U tikvicu uliti 50 ml TAE 0,5 x
3. Otopiti u mikrovalnoj pećnici 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 prekriti kutijom
7. Pričekati 15 – 20 min dok se gel napravi

2.3. Određivanje najvjerojatnijeg broja *Enterococcus* spp. u uzorcima dagnji

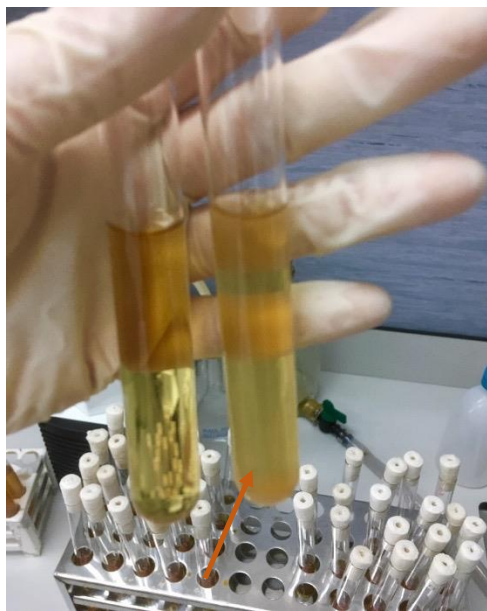
Koncentracija crijevnih enterokoka u dagnjama određivana je metodom najvjerojatnijeg broja (MPN) prema WHO/UNEP (1995). Za svaki uzorak korišteno je devet dagnji. Meso i međuljuštarna tekućina nožićem su odvojene od ljuštore te su zajedno izvagane. Potom su prebačene u posudu za miksanje gdje je dodana 0,1-postotna peptonska voda kao otapalo, u omjeru 1 : 2. Sve je homogenizirano u homogenizatoru (Kinematica) 4 x 15 s, s pauzama od 15 s, te je potom ostavljeno 1 min kako bi se smjesa istaložila (Slika 10).



Slika 10. Heterogena smjesa prije homogenizacije (**lijevo**) i homogena smjesa nakon homogenizacije (**desno**).

Za dobivanje D0 razrjeđenja homogenata (homogenat u kojem je udio mesa i međuljuštune tekućine 10 %) dodavano je 140 ml otapala u 60 ml uzorka. Zatim su pripremljena još tri decimalna razrjeđenja homogenata (u svaki je stavljeno 10 ml prethodnog razrjeđenja + 90 ml peptonske vode).

MPN metoda jest metoda koja se zasniva na teoriji vjerojatnosti. Određivanje se provodi u nekoliko serija razrjeđenja koja se inokuliraju u nekoliko nizova epruveta s Azide dextrose broth (Rothe broth) hranjivom podlogom. U epruvete u prvom redu nacijepljeno je 10 ml D0 razrjeđenja. U epruvete u drugom redu nacijepljeno je 1 ml D0 razrjeđenja. U epruvete u trećem redu 1 ml D1 razrjeđenja, u epruvete u četvrtom 1 ml D2 razrjeđenja, a u epruvete u petom redu 1 ml D3 razrjeđenja. Epruvete su inkubirane 48 h pri $35 \pm 0,5$ °C. Zamućenje hranjive podloge nakon 48 h inkubacije jest pokazatelj moguće prisutnosti enterokoknih bakterija (Slika 11).



Slika 11. Epruveta sa замуćenom tekućom podlogom nakon inkubacije pokazatelj je mogućeg prisustva enterokoknih bakterija (narančasta strelica).

U svrhu potvrđivanja prisutnost crijevnih enterokoka u uzorku, potrebno je napraviti potvrdni test. Pozitivni uzorci inokulirani su uzorci u nove epruvete s etil violet azid (EVA) hranjivom podlogom i inkubirani 48 h pri $35 \pm 0,5$ °C. Specifičnost je ove podloge visoka selektivnost jer sadrži natrijevu kiselinu koja inhibira rast svih kontaminirajućih bakterija blokirajući njihov respiratorni lanac, bez negativnog učinka na rast enterokoka. Potvrdu prisutnosti crijevnih enterokoka upredstavlja ljubičasti talog na dnu epruvete nakon inkubacije (Slika 12).



Slika 12. Epruvete s pozitivnim (narančasta strelica) i negativnim rezultatom uzorka na enterokoke (plava strelica).

Kako bi utvrdili najvjerojatniji broj enterokoknih bakterija, izbrojane su epruvete s pozitivnim reakcijama u svakom nizu od pet epruveta i iščitani su rezultati koristeći se MPN tablicom (Tablica 17).

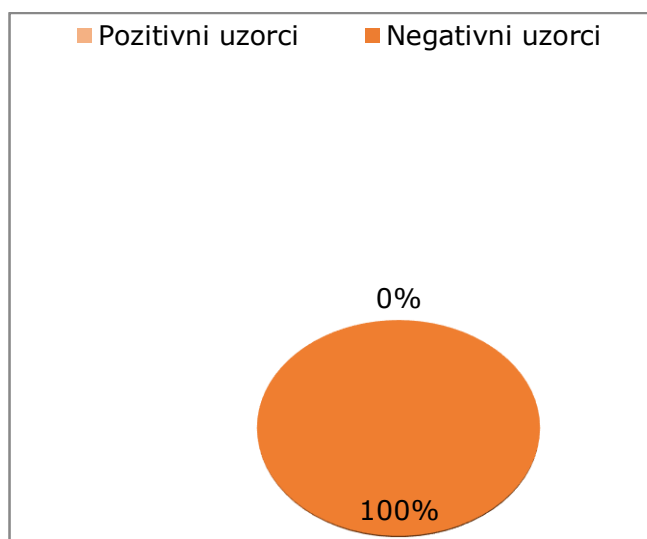
Tablica 17. Tablica za očitavanje najvjerojatnijeg broja bakterija (MPN) (prema: Blodgett, 2010).

Positive tubes	MPN/g ou ml	Confidence limits (95%)		Positive tubes	MPN/g ou ml	Confidence limits (95%)	
		Low	High			Low	High
0-0-0	<1.8	–	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.09	6.8	4-1-0	17	6	40
0-1-0	1.8	0.09	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.7	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.7	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	50
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	70
1-0-0	2	0.1	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4	0.7	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6	1.8	15	4-3-0	27	9.9	70
1-1-0	4	0.7	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8.1	3.4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8.3	3.4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3.5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	11	3.5	22	5-0-0	23	6.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6.8	1.8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4.1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4.1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3.5	26	5-3-3	180	70	400
3-1-1	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1,100
3-3-2	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6.8	40	5-5-1	350	100	1,100
3-4-1	24	9.8	70	5-5-2	540	150	1,700
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2,600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1,600	400	4,600
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1,600	700	–
4-0-2	21	6.8	40				

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Parazitološka pretraga sredozemne dagnje na prisustvo nametnika *Cryptosporidium* spp.

Od ukupno 240 uzoraka; 120 uzoraka škrga, po 30 za svaki vremenski interval (0, 12, 24 i 48 h) i jednako toliko uzoraka plašta, također po 30 za svaki vremenski interval, analizirano je na prisustvo *Cryptosporidium* spp. Niti jedan uzorak nije dao pozitivan rezultat (Slika 13), što je vidljivo i iz prikaza rezultata elektroforeze (Slika 14-18) ukazuje da konzumacija dagnje nakon 48 h izlaganja antropogenom zagađenju na specifičnom području ne predstavlja rizik od infekcije *Cryptosporidium* spp. za čovjeka. S obzirom na negativni rezultat, nije bilo moguće utvrditi vrijeme potrebno za pročišćavanje dagnji jer one nisu akumulirale nametnika tijekom izlaganja zagađenju u morskoj sredini.



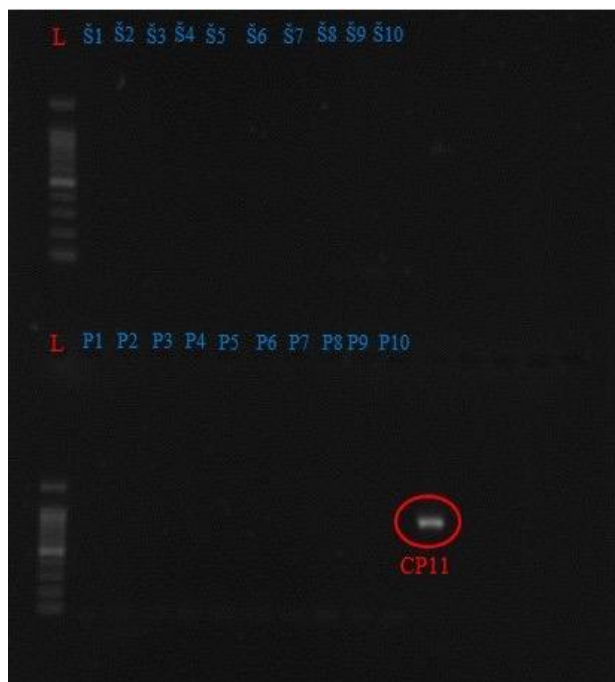
Slika 13. Udio *Cryptosporidium* spp. u istraživanom uzorku sredozemne dagnje *Mytilus galloprovincialis*.



Slika 14. Prikaz rezultata elektroforeze uzoraka DNA umnoženih nested PCR reakcijom (0 h Š 1 – 30). Pozitivna kontrola (DNA referentnog uzorka *Cryptosporidium parvum*, CP11) obilježena je crvenim krugom i oznakom CP11. *L-biljeg



Slika 15. Prikaz rezultata elektroforeze uzoraka DNA umnoženih nested PCR reakcijom (0 h P 1 – 30). Pozitivna kontrola (DNA referentnog uzorka *Cryptosporidium parvum*, CP11) obilježena je crvenim krugom i oznakom CP11. *L-biljeg



Slika 16. Prikaz rezultata elektroforeze uzoraka DNA umnoženih nested PCR reakcijom (12 h Š 1 – 30 i 12 h P 1 – 30). Pozitivna kontrola (DNA referentnog uzorka *Cryptosporidium parvum*, CP11) obilježena je crvenim krugom i oznakom CP11. Oznaka L predstavlja biljeg. Oznake Š1: uzorci 1, 2 i 3 škrge 12 h; Š2: uzorci 4, 5 i 6 škrge 12 h; Š3: uzorci 7, 8 i 9 škrge 12 h; Š4: uzorci 10, 11 i 12 škrge 12 h; Š5: uzorci 13, 14 i 15 škrge 12 h; Š6: uzorci 16, 17 i 18 škrge 12 h; Š7: uzorci 19, 20 i 21 škrge 12 h; Š8: uzorci 22, 23 i 24 škrge 12 h; Š9: uzorci 25, 26 i 27 škrge 12 h; Š10: uzorci 28, 29 i 30 škrge 12 h, te P1: uzorci 1, 2 i 3 plašt 12 h; P2: uzorci 4, 5 i 6 plašt 12 h; P3: uzorci 7, 8 i 9 plašt 12 h; P4: uzorci 10, 11 i 12 plašt 12 h; P5: uzorci 13, 14 i 15 plašt 12 h; P6: uzorci 16, 17 i 18 plašt 12 h; P7: uzorci 19, 20 i 21 plašt 12 h; P8: uzorci 22, 23 i 24 plašt 12 h; P9: uzorci 25, 26 i 27 plašt 12 h; P10: uzorci 28, 29 i 30 plašt 12 h.



Slika 17. Prikaz rezultata elektroforeze uzoraka DNA umnoženih nested PCR reakcijom (24 h Š 1 – 30 i 24 h P 1 – 30). Pozitivna kontrola (DNA referentnog uzorka *Cryptosporidium parvum*, CP11) obilježena je crvenim krugom i oznakom CP11. Oznaka L predstavlja biljeg. Oznake Š1- uzorci 1, 2 i 3 škrge 24 h, Š2 uzorci 4, 5 i 6 škrge 24 h, Š3- uzorci 7, 8 i 9 škrge 24 h, Š4- uzorci 10,11 i 12 škrge 24 h, Š5- uzorci 13, 14 i 15 škrge 24 h, Š6 uzorci 16, 17 i 18 škrge 24 h, Š7- uzorci 19, 20 i 21 škrge 24 h, Š8- uzorci 22, 23 i 24 škrge 24 h, Š9- uzorci 25, 26 i 27 škrge 24 h, Š10- uzorci 28, 29 i 30 škrge 24 h, te P1-uzorci 1, 2 i 3 plašt 24 h, P2 uzorci 4, 5 i 6 plašt 24 h, P3- uzorci 7, 8 i 9 plašt 24 h, P4- uzorci 10,11 i 12 plašt 24 h, P5- uzorci 13, 14 i 15 plašt 24 h, P6 uzorci 16, 17 i 18 plašt 24 h, P7- uzorci 19, 20 i 21 plašt 24 h, P8- uzorci 22, 23 i 24 plašt 24 h, P9- uzorci 25, 26 i 27 plašt 24 h, P10- uzorci 28, 29 i 30 plašt 24 h.



Slika 18. Prikaz rezultata elektroforeze uzoraka DNA umnoženih nested PCR reakcijom (48 h Š 1 – 30 i 48 h P 1 – 30). Pozitivna kontrola (DNA referentnog uzorka *Cryptosporidium parvum*, CP11) obilježena je crvenim krugom i oznakom CP11. Oznaka L predstavlja biljeg. Oznake Š1- uzorci 1, 2 i 3 škrge 48 h, Š2 uzorci 4, 5 i 6 škrge 48 h, Š3- uzorci 7, 8 i 9 škrge 48 h, Š4- uzorci 10,11 i 12 škrge 48 h, Š5- uzorci 13, 14 i 15 škrge 48 h, Š6 uzorci 16, 17 i 18 škrge 48 h, Š7- uzorci 19, 20 i 21 škrge 48 h, Š8- uzorci 22, 23 i 24 škrge 48 h, Š9- uzorci 25, 26 i 27 škrge 48 h, Š10- uzorci 28, 29 i 30 škrge 48 h, te P1-uzorci 1, 2 i 3 plašt 48 h, P2 uzorci 4, 5 i 6 plašt 48 h, P3- uzorci 7, 8 i 9 plašt 48 h, P4- uzorci 10,11 i 12 plašt 48 h, P5- uzorci 13, 14 i 15 plašt 48 h, P6 uzorci 16, 17 i 18 plašt 48 h, P7- uzorci 19, 20 i 21 plašt 48 h, P8- uzorci 22, 23 i 24 plašt 48 h, P9- uzorci 25, 26 i 27 plašt 48 h, P10- uzorci 28, 29 i 30 plašt 48 h.

Dobiveni rezultati podudaraju se s prethodno objavljenima (Tedde i sur., 2013), koji su istraživali prisutnost *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. u dvije vrste školjkaša, sredozemne dagnje (*M. galloprovincialis*) i europske kamenice (*Crassostrea gigas*), namjenjenih ljudskoj prehrani na talijanskoj Sardiniji. Uzorke su prikupljali od travnja 2011. do veljače 2012. godine, i to 1095 uzoraka *M. galloprovincialis* te 240 uzoraka *C. gigas*, uzorkujući škrge i probavnu

žlijezdu koje su potom homogenizirali u PBS-u, te odmastili korištenjem dietil etera. Preliminarni test izveden je na 20 dagnji koje su cijepljene s 1 mL otopine oocista izoliranih iz fecesa teladi i mačaka prirodno zaraženog s *Cryptosporidium* spp. Konačni rezultati nakon obrade svih školjkaša ukazali su na negativan nalaz *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. Više različitih čimbenika može biti razlog ovakvim rezultatima: smanjena koncentracija oocista prisutnih u vodi, kemijski čimbenici (amonijak, salinitet, pH) te fizički čimbenici, posebice sunčeve zrake koje mogu imati negativan utjecaj na opstanak protozoa (Giangaspero i sur., 2009).

U Kaliforniji se dvije godine provodilo istraživanje čiji je cilj bio na dva različita obalna područja istražiti prisutnost *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. u dagnji (*M. galloprovincialis*). Jedno je područje bilo pod utjecajem ispiranja s kopna, a drugo područje na kojem obitavaju morski lavovi (*Zalophus californianus*). Ukupno je sakupljen 961 uzorak dagnji, od čega jedna polovica tijekom sušnog, a druga tijekom vlažnog razdoblja. Na oba područja prilikom svakog uzorkovanja tijekom te dvije godine uzeto je najmanje 40 dagnji. Školjkaš korišten kao pokazatelj *Cryptosporidium* spp. jest *M. californianus*. Iz dagnji je uzeta hemolimfa, a tkivo je homogenizirano, i to ukupno 54 uzorka, od čega se svaki uzorak sastojao od tri alikvota pojedinačne veličine od 4 g. Prilikom homogenizacije uzeta su tkiva od 30 dagnji sa svake lokacije. Homogena smijesa dagnji prosijana je koristeći sito s otvorima od 100 µm kako bi se dobila tri alikvota pojedinačne veličine 4 g. Nakon obrade homogenata uzorci su podvrgnuti DNA izolaciji i PCR amplifikaciji. Uzorci hemolimfe (ukupno 961 uzorak) prikupljeni su iz 30 jedinki dagnji sa svake lokacije (White Rock, Santa Rosa Creek, Point Lobos, Carmel River i Ano Nuevo Island), nakon čega je DNA izolirana i amplificirana u PCR reakciji. Svi uzorci dagnji bili su negativni na prisustvo *Cryptosporidium* spp. (Adell i sur., 2014).

Site	Season	Hemolymph ^b	Mussel homogenate ^c
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i>
White Rock	Dry	0 (0/118)	0 (0/9)
	Wet	0 (0/120)	0 (0/3)
Santa Rosa Creek	Dry	0 (0/121)	0 (0/12)
	Wet	0 (0/120)	0 (0/3)
Point Lobos	Dry	0 (0/121)	0 (0/9)
	Wet	0 (0/90)	0 (0/3)
Carmel River	Dry	0 (0/119)	0 (0/9)
	Wet	0 (0/152)	0 (0/6)
Año Nuevo Island	Dry	NC ^e	NC
	Wet	NC	NC
Total collected	Dry	0 (0/479)	0 (0/39)
	Wet	0 (0/482)	0 (0/15)
	Overall	0 (0/961)	0 (0/54)

Slika 19. Prevalencija *Cryptosporidium* spp. u uzorcima hemolimfe i tkivu dagnje *M. californianus* prikupljene uzduž obale središnje Kalifornije (prema: Adell i sur., 2014).

3.2. Bakteriološka pretraga sredozemne dagnje na prisustvo enterokoknih bakterija

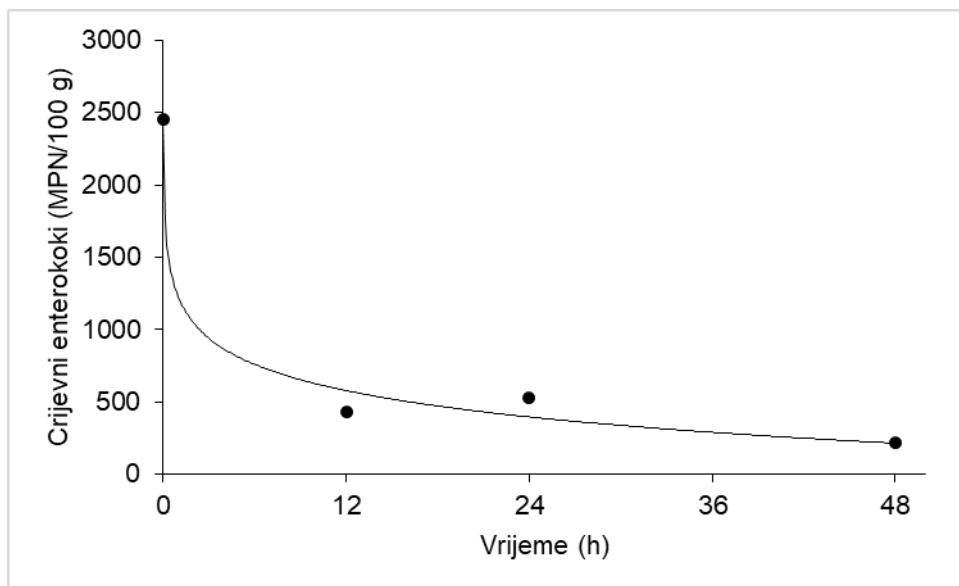
Obzirom na to da *Cryptosporidium* spp. nije izoliran iz dagnji, korelaciju s enterokoknim bakterijama nije se moglo utvrditi.

Rezultati koncentracije enterokoknih bakterija i učinkovitosti pročišćavanja bili su očekivani, uz poneka odstupanja. Vidljivo je odstupanje među koncentracijama iz školjkaša pročišćavanih 12 sati i 24 sata. Suprotno očekivanom, veća je koncentracija enterokoknih bakterija uočena u uzorcima pročišćavanim 24 sata naspram onih pročišćavanih 12 sati. Razlog tomu može biti nasumičnost prilikom uzimanja dagnji iz pergolara za mikrobiološku analizu. Ako je uzeto više školjkaša koji su bili na rubovima pergolara, moguće je da je do njih stigla veća količina onečišćene vode, a tako i veći broj samih bakterija, u odnosu na količinu koja je stigla do onih koje su bile zaklonjenije unutar pergolara (Tablica 18). Nakon 48 sati pročišćavanja koncentracija enterokoka, kad se uzme prosjek tri replike, znatno je smanjena, što je i vidljivo iz grafičkog prikaza (Slika 20). Rezultate pročišćavanja enterokoka možemo usporediti s

purifikacijom *E. coli*, čija se koncentracija u dagnji nakon 12 sati pročišćavanja također znatno smanjila. Nakon toga slijedi sporiji pad koncentracije, da bi se 48 sati nakon purifikacije koncentracija smanjila na iznos manji od najmanje dozvoljene koncentracije za uzgojno područje A ($\leq 230/100$ g tkiva i međuljuštune tekućine) (Žuvić, 2018).

Tablica 18. Prikaz koncentracije enterokoka određenih pomoću MPN tablice. (R1-replika 1, R2-replika 2, R3-replika 3).

Vrijeme uzorkovanja	R1	R2	R3
0 h	/	2450/100 g tkiva i međuljuštune tekućine	/
12 h	790/100 g tkiva i međuljuštune tekućine	140/100 g tkiva i međuljuštune tekućine	270/100 g tkiva i međuljuštune tekućine
24 h	390/100 g tkiva i međuljuštune tekućine	790/100 g tkiva i međuljuštune tekućine	390/100 g tkiva i međuljuštune tekućine
48 h	93/100 g tkiva i međuljuštune tekućine	220/100 g tkiva i međuljuštune tekućine	330/100 g tkiva i međuljuštune tekućine



Slika 20. Prikaz smanjenja srednje vrijednosti koncentracije crijevnih enterokoka (MPN/ 100 g) u dagnjama tijekom purifikacije.

4. ZAKLJUČAK

U ovom je diplomskom radu istražena prisutnost *Cryptosporidium* spp. i koncentracija enterokoknih bakterija te uspješnost pročišćavanja dagnji (*M. galloprovincialis*) iz uzgojnog područja A Stipan Jaz u Marinskom zaljevu, nakon 48 h izloženosti školjkaša neposrednom antropogenom utjecaju u vodenom stupcu u Kaštel Sućurac, na dubini od 1 m.

S obzirom na dobivene rezultate, može se zaključiti sljedeće:

1. Svi uzorci analizirani na prisutnost *Cryptosporidium* spp. u tkivima škrga i plašta bili su negativni. Na takav ishod mogli su djelovati vrijeme u kojem su dagnje bile izložene antropogenom utjecaju, niska koncentracija oocista prisutnih u vodi koja nije bila dostatna da se oociste uspješno akumulira u dagnjama te različiti kemijski (amonijak, pH, salinitet) i fizički čimbenici (temperatura i sunčevo zračenje), koji su mogli negativno utjecati na preživljavanje sporocisti nametnika *Cryptosporidium* spp. u morskom okolišu.
2. Ispitivanje koncentracije enterokoknih bakterija u dagnjama i učinkovitosti pročišćavanja dalo je očekivane rezultate, koji su potvrdili značajno smanjenje koncentracije enterokoka tijekom 48 sati pročišćavanja.
3. Kako bi se utvrdila stvarna mogućnost pročišćavanja *Cryptosporidium* spp. u pokusnim sustavima za pročišćavanje, neophodno je produžiti vrijeme izlaganja dagnji antropogenom utjecaju kako bi se vremenski period isključio kao razlog odsutnosti *Cryptosporidium* spp. u dagnji.

5. LITERATURA

- 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.
- Alvarez-Pellitero P, Quiroga MI, Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Palenzuela O, Padrós F, Vázquez S, Nieto JM. 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron micro-scope description and histopathological study. *Dis Aquat Organ*, 62: 33–45.
- Alvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A. 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol*, 32: 1007–1021.
- Antolović R, Frece J, Gobin I, Hrenović J, Kos B, Markov K, Mlinarić-Missoni E, Nova, J, Ožanić M, Pinter LJ, Plečko V, Pleško S, Šantić M, Ševgić Klarić M, Šeruga Musić M, Škorić D, Šušković J. 2016. Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, Hrvatska.
- Ashbolt NJ, Grabow WOK, Snozzi M. 2001. Indicators of microbial water quality. Water quality: Guidelines, standards and health – Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease (ur. L. Fewtrell, J. Bartram). WHO Water Series, IWA Publishing, London, 289–315.
- Barugahare R, Dennis MM, Becker JA, Šlapeta J. 2011. Detection of *Cryptosporidium molnari* oocysts from fish by fluorescent-antibody staining assays for *Cryptosporidium* spp. affecting humans. *Appl Environ Microbiol*, 77: 1878–1880.
- Blackburn BG, Mazurek JM, Hlavsa M, Park J, Tillapaw M, Parrish MK, Salehi E, Franks W, Koch E, Smith F, Xiao L, Arowood M, Hill V, Silva A, Johnston S, Jones JL. 2006. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerg Infect Dis*, 12(4): 684–686.

- Blodgett R. 2010. Laboratory methods–BAM Appendix 2: most probable number from serial dilutions. Dostupno sa:
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>,
 priszupljeno: siječanj, 2019.
- Bruce BB, Blass MA, Blumberg HM, Lennox JL, Rio C, Horsburgh CR. 2000. Risk of *Cryptosporidium parvum* transmission between hospital roommates. Clin Infect Dis, 31(4): 947–950.
- Cabelli VJ, Dufour AP, McCabe LJ, Levin MA. 1982. Swimming-associated gastroenteritis and water-quality. Am. J. Epidemiol., 115(4): 606–616.
- CAB International (CABI). 2018. *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel). Dostupno sa: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/73756>, pristupljeno: rujan, 2018.
- Caccio MS, Widmer G. 2014. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer, Rim, 6–70.
- Casemore DP. 1989. Sheep as a source of human cryptosporidiosis. J Infect, 19: 101–104.
- Chalmers RM, Giles M. 2010. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. J Appl Microbiol, 109: 1487–1497.
- Current WL, Reese NC, Ernst JV, Bailey WS, Heyman MB, Weinstein WM. 1983. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. N Engl J Med 308(21): 1252–1257.
- Department of Agriculture, Forestry and Fisheries (DAFF). 2012. Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dostupno na:
http://www.nda.agric.za/daaDev/sideMenu/fisheries/03_areasofwork/Aquaculture/BIODIVERSITY/M.%20galloprovincialis%20BRBA%2012.12.12.pdf, pristupljeno: rujan, 2018.
- Dončević L. 2017. Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 21. str.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Dostupno sa:
<http://www.fao.org/fisheiry/species/3529/en>, pristupljeno: studeni, 2018.

- Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* Microbiology, 155: 1749–1757.
- Fleisher JM, Kay D, Wyer M, Merrett H. 1996. The enterovirus test in the assessment of recreational water-associated gastroenteritis Water Res., 30 (10): 234–2346.
- Gait R, Soutar RH, Hanson M, Fraser C, Chalmers R. 2008. Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. Vet Rec, 162: 843–845.
- Gameson ALH, Gould DJ. 1985. Investigations of Sewage Discharges to Some British Coastal Waters. Chapter 8. Bacterial Mortality, Part 2. Report No: TR222 Water Research Centre, Medmenham.
- Gibson-Kueh S, Yang R, Thuy NTN, Jones JB, Nicholls PK, Ryan U. 2011. The molecular characterization of an Eimeria and *Cryptosporidium* detected in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. Vet Parasitol, 181: 91–96.
- 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.
- 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.
- Hannah J, Riordan T. 1988. Case to case spread of cryptosporidiosis; evidence from a day nursery outbreak. Public Health, 102(6): 539–544.
- Harper CM, Cowell NA, Adams BC, Wohlsen TD, Langley AJ. 2002. Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. Commun Dis Intell Q Rep, 26(3): 449–450.
- Harris JR, Adrian M, Petry F. 2004. Amylopectin: a major component of the residual body in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Parasitology, 128(3): 269–282.

- Heijbel H, Slaine K, Seigel B, Wall P, McNabb SJ, Gibbons W, Istre GR. 1987. Outbreak of diarrhea in a day care center with spread to household members: the role of *Cryptosporidium*. *Pediatr Infect Dis J*, 6(6): 532–535.
- Hellard M, Hocking J, Willis J, Dore G, Fairley C. 2003. Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men. *Sex Transm Infect*, 79(5): 412–414.
- Hoek MR, Oliver I, Barlow M, Heard L, Chalmers R, Paynter S. 2008. Outbreak of *Cryptosporidium parvum* among children after a school excursion to an adventure farm, south west England. *J Water Health*, 6(3): 333–338.
- Hoover DM, Hoerr FJ, Carlton WW, Hinsman EJ, Ferguson HW. 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Block and Schneider. *J Fish Dis*, 4: 425–428.
- Hunter PR, Hadfield SJ, Wilkinson D, R.Lake I, Harrison F, Chalmers R. 2007. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerg Infect Dis*, 13: 82–88.
- Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Syed Q, Verlander N, Chalmers R, Morgan K, Nichols G, Beeching N, Osborn K. 2004. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerg Infect Dis*, 10: 1241–1249.
- Huzjak F. 1999. Učestalost oocisti protozoona *Cryptosporidium* sp. u izmetinama pasa s područja općine Čazma. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, 52. str.
- Janoff NE, Reller BL. 1987. *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 967–975.
- Kay D, Bartram J, Prüss A, Ashbolt N, Wyer MD, Fleisher JM, Fewtrell L, Rogers A, Rees G. 2004. Derivation of numerical values for the World Health Organization guidelines for recreational waters *Water Res.*, 38: 1296–1304.
- Kay D, Fleisher JM, Salmon RL, Jones F, Wyer MD, Godfree AF, Zelenauchjacquotte Z, Shore R. 1994. Predicting the likelihood of gastroenteritis from sea bathing results from randomized exposure *Lancet*, 344(8927): 905–909.

- Krstulović N, Šolić M. 1997. Mikrobiološko zagađenje mora. Hrvatska vodoprivreda, 6: 31–35.
- Laurent F, Eckmann L, Savidge TC, Morgan G, Theodos C, Naciri M, Kagnoff MF. 1997. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect Immun*.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization, 5-38.
- Lee MB, Greig JD. 2010. A review of gastrointestinal outbreaks in schools: effective infection control interventions. *J Sch Health*, 80(12): 588–598. doi: 10.1111/j.1746-1561.2010.00546. x.
- Levine ND. 1985. *Veterinary protozoology*. Elsevier, Iowa. 414. str.
- Linardić M. 2014. Procjena prilagodbe dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) na genotoksični stres. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 49. str.
- Ma P, Soave R. 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis*, 147: 824–828.
- Mak JW. 2004. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. *Trop Biomed*, 21(2): 39–50.
- Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin C.E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 70(6): 1156–1160.
- 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 EAAP Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Mladineo I, Dalmacijapapir, Split, 288–288.
- 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.

- Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Payer R, Thomson RC, Olson M, Lal A, Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J Eukaryot Microbiol, 49: 433–440.
- Mote BL; Turner JW, Lipp EK. 2012. Persistence and growth of the fecal indicator bacteria enterococci in detritus and natural estuarine plankton communities. Appl Environ Microbiol., 78(8): 2569–77. DOI: 10.1128/AEM.06902-11 PMID: 22327586.
- Navin TR, Juranek DD. 1984. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. Rev Infect Dis, 6(3): 313–327.
- 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. Vet Parasitol, 176: 145–150.
- Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley J. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology, 70(4): 592–598.
- Nina JM, McDonald V, Deer RM, Wright SE, Dyson DA, Chiodini PL, McAdam KPWJ. 1992. Comparative study of the antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts. Parasite Immunol, 14: 227–232.
- Ogunkolade BW, Robinson HA, McDonald V, Webster K, Evans DA. 1993. Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. Parasitol Res, 79: 385–388.
- Ortega YR, Sheehy RR, Cama VA et al. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. J Protozool, 38: 40S–41S.
- Palenzuela O, Alvarez-Pellitero P, Sitja-Bobadilla A. 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium molnari* reveals a distinct piscine clade. Appl Environ Microbiol., 76: 7646–7649.
- Pandak N, Zeljka K, Cvitkovic A. 2006. A family outbreak of cryptosporidiosis: probable nosocomial infection and person-to-person transmission. Wien Klin Wochenschr, 118(15 – 16): 485–487.

- Paperna I, Vilenkin M. 1996. Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, Piscicryptosporidium, for species infecting fish. *Dis Aquat Organ.*, 27: 95–101.
- Pavlásek I. 1983. *Cryptosporidium* sp. in *Cyprinus carpio* Linne, 1758 in Czechoslovakia. *Folia Parasitol*, 30: 248.
- Peng MM, Xiao L , Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante A.A, Weltman AC, Ong CS, MacKenzie WR, Lal AA, Beard C.B. 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis.*,3(4): 567–573.
- Petrić M. 2015. *PowerPoint* prezentacija iz predmeta Biologija morskih beskralježnjaka. Sveučilište u Splitu.
- Rengifo-Herrera C, Ortega-Mora LM, Gomez-Bautista M, Garcia-Pena FJ, Garcia-Parraga D, Pedraza-Diaz S. 2013. Detection of a novel genotype of *Cryptosporidium* in Antarctic pinnipeds. *Vet Parasitol.*, 191: 112–118.
- Rengifo-Herrera C, Ortega-Mora LM, Gomez-Bautista M, Garcia-Moreno FT, Garcia-Parraga D, Castro-Urda J, Pedraza-Diaz S. 2011. Detection and characterization of a *Cryptosporidium* isolate from a southern elephant seal (*Mirounga leonina*) from the Antarctic peninsula. *Appl Environ Microbiol.*, 77: 1524–1527.
- Robertson LJ. 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(3): 201–216.
- Robertson LJ, Chalmers RM. 2013. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? *Trends Parasitol.*, 29(1): 3–9. doi: 10.1016/j.pt.2012.10.003.
- Robertson LJ, Gjerde B. 2001. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J Food Prot.*, 64(11): 1793–1798.
- Robinson G, Wright S, Elwin K, J. Hadfield S, Katzer F, Bartley P, R. Hunter P, Nath M, A. Innes E, M. Chalmers R. 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman

- and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae); morphology, biology and phylogeny. *Int J Parasitol.*, 40: 1539–1548.
- Roper MM, Marshall KC. 1978. Effects of a clay mineral on microbial predation and parasitism of *Escherichia coli* *Microbial Ecol.*, 4(4): 279–289.
- Silverlås C, Mattsson JG, Insulander M, Lebbad M. 2012. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *Int J Parasitol.*, 42(11): 963–967. doi: 10.1016/j.ijpara. 2012.08.008.
- Sinton W, Davies-Colley RJ, Bell RG. 1994. Inactivation of enterococci and fecal-coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(6): 2040–2048.
- Smith HV, Caccio` SM, Tait A, McLauchlin J, Thomson RC. 2006. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends Parasitol.*, 22(4): 160–167.
- Spano F, Putignani L, Crisanti A, Sallicandro P, Morgan U, M. Le Blancq S, Tchack L, Tzipori S, Widmer G. 1998. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *J Clin Microbiol.*, 36(11): 3255–3259.
- Stantic-Pavlinic M, Xiao L, Glaberman S, Lal A, Oražen T, Rataj-Verglez A, Logar J, Berce I. 2003. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wien Klin Wochenschr*, 115(3 – 4): 125–127.
- Stilinović B; Hrenović J. 2009.: *Praktikum iz bakteriologije*. Kugler, Zagreb, Hrvatska.
- 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.
- Thomson RC, Clode PL, Borrowski H. 2008. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 509–516.

- Tolušić T. 2017. Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. Dostupno na: <http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/HranaZivPod/Plan%20pra%C4%87enja%20kakvo%C4%87e%20mora%20i%20%C5%A1koljka%C5%A1a%202017.pdf>, pristupljeno: rujan, 2018.
- Vidyasagar A. 2015. What are bacteria?. Dostupno sa: <https://www.livescience.com/51641-bacteria.html>, pristupljeno: listopad, 2018.
- World Health Organization/United Nations Environment Programme (WHO/UNEP). 1995. Determination of faecal streptococci in sea water by the multiple test tube (MPN) method. Reference Methods For Marine Pollution Studies No. 23 (Rev. 1)
- Wilkinson RJ, 2001. Modelling Faecal Coliform Dynamics in Streams and Rivers. Unpublished Ph.D. Thesis. University of Wales, Aberystwyth.
- Xiao L. 2009. Overview of *Cryptosporidium*. Presentations at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists
- Xiao L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.*, 124: 80–89.
- Yoder JS, Beach MJ. 2007. Cryptosporidiosis surveillance - United States, 2003–2005. *MMWR*, 56(7): 1–10.
- Žuvić L. 2018. Epidemiologija *Cryptosporidium* spp. u školjkaša pod antropogenim utjecajem. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Sveučilište u Splitu, 67 str.