

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2012-05/43

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1085
Naslov projekta	Virusna in mikrobiološka kontaminacija šoljk ter prisotnost morskih biotoksinov v školjkah
Vodja projekta	18888 Andrej Kirbiš
Naziv težišča v okviru CRP	5.09.13 Virusna in mikrobiološka kontaminacija šoljk ter prisotnost morskih biotoksinov v školjkah
Obseg raziskovalnih ur	1261
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	10.2010 - 09.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	105 Nacionalni inštitut za biologijo 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta 2413 Univerza na Primorskem Fakulteta za vede o zdravju
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.05 Zdravstveno varstvo živil živalskega izvora
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo

2.Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	4.03
- Veda	4 Kmetijske vede
- Področje	4.03 Veterina

3.Sofinancerji²

	Sofinancerji		
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje	
	Naslov	Dunajska 22, Ljubljana	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

4. Povzetek projekta³

SLO

Poročilo povzema rezultate ciljnega raziskovalnega projekta V4-1085 v sklopu »Konkurenčnost Slovenije v letih 2006-13«, z naslovom "Virusna in mikrobiološka kontaminacija školjk ter prisotnost morskih biotoksinov v školjkah". V projektu so sodelovali Inštitut za higieno živil, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani (nosilec), Oddelek za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Morska biološka postaja Piran in Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem. Školjke so živilo, ki je vedno pogostejše na krožniku slovenskega potrošnika. V Sloveniji imamo tri registrirana školjčičišča - Seča, Strunjan ter Debeli rtič z letnim pridelkom 250 ton užitnih klapavic. Cilji projekta so bili v sled spremembe evropske zakonodaje na področju nadzora školjk implementacija kemijskih metod za ugotavljanje lipofilnih - DSP in PSP toksinov v školjkah. V EU je v pripravi tudi nova zakonodaja na področju ugotavljanja virusov v školjkah, zato smo se odločili vpeljati RT PCR metode za ugotavljanje norovirusov. V projektu je bil načrt izolirati posamezne vrste dinoflagelatov, ki proizvajajo različne toksine z analitskimi kemičnimi metodami kot je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, ter izdelava smernic dobre prakse, ki opredeljujejo korake v proizvodno oskrbovalno prehranski verigi pridelave in so namenjene različnim organizacijam v proizvodno oskrbovalno prehranski verigi. Vpeljali smo kemijsko metodo za ugotavljanje PSP in DSP toksinov, RT-PCR metodo za ugotavljanje norovirusov ter pripravili smernice za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi. Na izoliranih celicah toksičnih vrst dinoflagelatov in na naravnih - mešanih fitoplanktonskih vzorcih so bile opravljeni prve analize o vsebnosti lipofilnih toksinov z uporabo LC-MS/MS metode. Rezultati so potrdili vsebnost nekaterih lipofilnih toksinov v naravnih vzorcih fitoplanktona v času največje abundance toksičnih dinoflagelatov. V okviru projekta smo na novo vpeljali dve metodi, ki nam omogočata ugotavljati stres v klapavicah. Prva metoda je ugotavljanje sposobnosti razgradnje v lizosomih in je učinkovita za ugotavljanje splošnega stresa. Druga metoda omogoča ugotavljanje genotoksičnih učinkov v jedru hemocit v klapavicah (mikronukleusni test). Pripravili smo tudi smernice za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi. Nosilci živilske dejavnosti so zavezani k zagotavljanju in izvajanju ustreznih dobrih navad (praks), ki so potrebne za preprečevanje okužb z mikroorganizmi, med njimi tudi virusi. Živila se z virusi lahko okužijo že v fazi pridelave, lahko pa do okužbe pride naknadno pri obdelavi, predelavi, distribuciji kakor tudi v domači kuhinji. V ta namen je treba opraviti redno usposabljanje o higieni živil za vse zaposlene, ki rokujejo z živili. Usposabljanje mora biti dokumentirano in preverljivo. Na ta način smo izpolnili cilje, ki smo si jih zadali v projektu.

ANG

The report summarizes results of the Targeted research project V4-1085 as part of "Competitiveness of Slovenia in the years 2006-13", entitled: Viral and microbiological contamination of bivalves and presence of marine biotoxins in bivalves. Participating institutions were Institute of Food Hygiene, Veterinary Faculty and Department of Biotechnology, Microbiology and Food Safety, Faculty of Biotechnology, both University of Ljubljana, Marine Biology Station Piran and Faculty of Health Sciences, University of Primorska. Shellfish are ever more frequently on the menu of Slovenian consumers. Slovenia has three registered harvesting areas - Seča, Strunjan and Debeli rtič, their annual production reaches 250 tonnes of edible mussels. The objectives of the project were implementation of new methods for determination of shellfish biotoxins and noroviruses in shellfish (as required by the new EU legislation), determination of toxin-producing dinoflagellates species in Slovenian shellfish and development of good-practice guidelines for manufacturing organisations that would define each step regarding shellfish production in the food supply chain. Molecular real-time PCR methods for detection of noroviruses and *Vibrio parahaemolyticus* were implemented fulfilling the requirements set by the EU legislation. Regarding biotoxins, chemical methods for detection PSP and DSP toxins in shellfish were successfully implemented. The first

analyses of lipophilic toxins in isolated dinoflagellates cells and mixed phytoplankton samples using the LC-MS/MS methods were done as part of this project. The analyses confirmed the presence of some of the lipophilic toxins in phytoplankton at times of highest dinoflagellates abundance. Two methods for determination of stress levels in shellfish were implemented. The first assesses general stress level and is based on the capacity for lysosomal degradation. The second method allows determination of genotoxic effects in hepatocytes nuclei (micronuclear test). Guidelines for prevention of shellfish contamination with viruses have been developed. Food produce operators are required to follow good practice which is needed to prevent contamination with microorganisms, including viruses. Food can be infested during production or later during processing, distribution or before consumption in households. Regular education on food hygiene, which is documented and verifiable, is therefore required for all who professionally deal with food and the guidelines constructed as part of this project are part of this process. By the above mentioned achievements, all goals of the project were successfully achieved.

5. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu⁴

Vpeljali smo metodo za ugotavljanje PSP toksinov. Kromatografsko metodo smo preskusili na različnih HPLC kolonah po oksidaciji standardnih raztopin. Kot najustreznejša se je pokazala kolona Supelcosil LCABZ 5 μ (Supelco, 150 x 4,6 mm, 4 μ m) s predkolono s C18 polnilom DB. Mobilna faza je raztopina 0,1 M amonijev format s pH 6 z in brez 5 % MeCN. Delovanje metode smo preskusili na vzorcu obogatenih školjk, za katerega smo vedeli katere in koliko PSP toksinov vsebuje. Na vzorcu smo preskusili celoten postopek od ekstrakcije in čiščenja na SPE trdni fazi C18, oksidacije ekstraktov, do kromatografske določitve. Pripravili smo tudi vzorce, ki smo jih sami obogatili na 1/10 in 1 najvišje dovoljene vrednosti (MRL), ki znaša 800 μ g/kg. Pripravili smo standardni operacijski postopek za določanje PSP toksinov v školjkah s kemijsko metodo, ki se zdaj lahko uporablja kot nova referenčna presejalna metoda. Opravili smo osnovno validacijo, ki je potrebna za postavitve referenčne presejalne metode za določanje PSP toksinov s kemijsko metodo. Sledile so kemijske analize vzorcev školjk na PSP toksine, ki so potekale vzporedno z obstoječo referenčno biološko metodo. Rezultati primerjave novo vpeljane kemijske metode in biološkega poskusa so pokazali, da je metoda dobro vpeljana in primerna za rutinsko kemijsko presejalno metodo določanja PSP toksinov v školjkah. Metoda je bila akreditirana s strani SLOVENSKE AKREDITACIJE dne 23.4.2012. Potrditev akreditacije je na linku: <http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/katalogsi-lp.htm>; številka laboratorija: LP-021

Vpeljali smo metodo za določanje lipofilnih toksinov. Napisali smo standardiziran operativni postopek (SOP) za opisano metodo, po katerem bo delo potekalo v bodoče. Izvedli smo validacijo presejalne metode za določanje lipofilnih toksinov na nivoju 0,2 maksimalne dovoljene vrednosti lipofilnih toksinov v školjkah: 32 μ g/kg za OA, PTX2, AZA1, GYM in SPY1 ter 200 μ g/kg za YTX. Delovanje metode smo preskusili na slepem vzorcu školjk s standardnim dodatkom LBT na različnih koncentracijskih nivojih. Izvedli smo kemijske analize LBT v vzorcih školjk, ki so bile vzorčene za monitoring v letu 2010 in 2011. Rezultate smo primerjali z rezultati biološkega poskusa v tem obdobju. Metoda je bila s strani SLOVENSKE AKREDITACIJE akreditirana dne 23.4.2012. Potrditev akreditacije je na linku: <http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/katalogsi-lp.htm>; številka laboratorija: LP-021

V obdobju od januarja 2010 do marca 2012 smo na prisotnost norovirusne nukleinske kisline pregledali 70 vzorcev klapavic (*Mytilus galloprovincialis*). Školjke so bile vzorčene v treh slovenskih školjiščih: v Seči, Strunjanu in na Debelem rtiču tekom celega leta 2010 in 2011, le v letu 2012 je bilo vzorčenje le do meseca marca. Z metodo RT-PCR v realnem času smo norovirusno RNA ugotovili v 13 od skupno 70 vzorcev (18,6 %). Dokazani norovirusi so pripadali obema genskima skupinama – I in II. Pri dveh smo ugotovili noroviruse obeh genskih skupin, v 11 vzorcih le gensko skupino II.

Leta 2010 smo pri testiranju 35 vzorcev školjk norovirusno RNA dokazali v šestih vzorcih. Pri štirih

vzorcih je bila ugotovljena genska skupina II, vzorca, v katerih smo ugotovili obe genski skupini pa sta bila dva.

Leta 2011 smo testirali 27 vzorcev školjk in pri šestih dokazali norovirusno nukleinsko kislino, ugotovljena je bila le genska skupina II

Leta 2012 smo testirali le osem vzorcev in pri enem dokazali gensko skupino II.

Po posameznih školjčičih so bili rezultati sledeči:

V letu 2010 smo pri klapavicah vzorčenih v Strunjanu ugotovili norovirusno RNA pri štirih od skupno 12 vzorcev (33,3 %), pri dveh od skupno 9 z Debelega rtiča (22,2 %), le pri vzorcih iz Seče je med preiskanimi 14 nismo ugotovili.

Leta 2011 je bila norovirusna RNA prisotna pri dveh od skupno 12 vzorcev iz Strunjana (16,6 %), pri treh od 10 iz Seče (30,0 %) in pri enem od petih z Debelega rtiča (20,0 %).

Pri klapavicah, ki so bile vzorčene v obdobju med januarjem in marcem 2012 smo norovirusno RNA ugotovili pri enem od petih vzorčenj iz Strunjana (20,0 %).

V zadnji fazi projekta smo realizirali zastavljene cilje projekta v okviru fitoplanktonskih raziskav. Na izoliranih celicah toksičnih vrst dinoflagelatov (*Dinophysis caudata*, *D. fortii*, *D. tripos*) in na naravnih - mešanih fitoplanktonskih vzorcih so bile opravljeni prve analize o vsebnosti lipofilnih toksinov z uporabo LC-MS/MS metode. Rezultati so potrdili vsebnost nekaterih lipofilnih toksinov v naravnih vzorcih fitoplanktona v času največje abundance toksičnih dinoflagelatov (september 2010; podatki pridobljeni iz nacionalnega monitoringa MKO/VURS o nadzoru morske vode na slovenskih školjčičih), ne pa tudi v izolatih posameznih vrst. To narekuje potrebo po nadaljnjih raziskavah, saj ni bila dokazana sinteza lipofilnih toksinov na izbranih vrstah iz rodu *Dinophysis*. Hkrati tudi še ne moremo natančneje opredeliti sezonskega pojavljanja določenih lipofilnih toksinov gleda na sezonsko pojavljanje vrst *Dinophysisa*.

Članek z naslovom "Preliminary study on vertical migrations of dinoflagellates in a dynamic coastal sea (Gulf of Trieste, northern Adriatic)" avtoric J. Francé in P. Mozetič je bil sprejet v objavo v reviji *Acta Adriatica*. Članek obravnava nekatere ekološke značilnosti dinoflagelatov, med drugim tudi toksičnih vrst in se tako v širšem smislu navezuje na vsebino CRP projekta.

Članek z naslovom "Toksičnost gojenih klapavic in zapore njihove prodaje v povezavi s pojavljanjem toksičnega fitoplanktona v slovenskem morju" avtorjev Francé, Mozetič, Obal, Kirbiš je v zaključni fazi pisanja in obravnava analizo medletnih variacij abundance *Dinophysis* spp. na slovenskih gojiščih školjk. Avtorji so izpostavili razlike v abundancah v letih, ko abundanca ni odstopala od dolgoletnega povprečja in v letu 2010, ki je bilo glede tega izjemno - tako po abundanci osebkov *Dinophysis* spp., kot po trajanju toksičnosti školjk in posledično prepovedi prodaje.

V okviru projekta smo na novo vpeljali dve metodi, ki nam omogočata ugotavljati stres v klapavicah. Prva metoda je ugotavljanje sposobnosti razgradnje v lizosomih in je učinkovita za ugotavljanje splošnega stresa. Zaradi poškodb v membrani lizosomov je okvarjeno delovanje encimskega sistema v lizosomih in tudi povečana prepustnost lizosomalnih membran. Druga metoda omogoča ugotavljanje genotoksičnih učinkov v jedru hemocit v klapavicah (mikronukleusni test). Zaradi delovanja genotoksičnih snovi pride do poškodb DNA in do napak pri delitvi kromosomov. Oba testa se uporabljata pri opredelitvi zdravstvenega stanja klapavic in sta tudi standardizirana in priporočena za biomonitoring (ICES, 2011 in Bolognesi in Fenech, 2012).

Oba testa smo uporabili na klapavicah, vzgojene v školjčičih ob slovenski obali. Ugotovili smo, da lizosomi zadržijo barvilo nevtralnno rdeče 20 do 30 minut, medtem ko je frekvenca mikronukleusov v razponu od 1,5 do 5,5 %.

Izdelali smo smernice za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi

Nosilci živilske dejavnosti so zavezani k zagotavljanju in izvajanju ustreznih dobrih navad (praks), ki so potrebne za preprečevanje okužb z mikroorganizmi, med njimi tudi virusi. Živila se z virusi lahko okužijo že v fazi pridelave, lahko pa do okužbe pride naknadno pri obdelavi, predelavi, distribuciji kakor tudi v domači kuhinji. V ta namen je treba opraviti redno usposabljanje o higieni živil za vse zaposlene, ki rokujejo z živili. Usposabljanje mora biti dokumentirano in preverljivo.

Nosilci živilske dejavnosti so dolžni tudi približati načela dobre gospodinjske prakse potrošnikom z namenom preprečevanja zdravstvenih posledic, ki jih povzročajo okužbe z virusi zaradi podaljševanja verige »od polja do mize« ter čedalje pogostejšega uživanja živil, katerih pred zaužitjem ni potrebno toplotno obdelati.

SPLOŠNA PRIPOROČILA ZA PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE Z VIRUSI V ŠKOLJČIŠČU

- Školjke se najpogosteje okužijo preko vode okužene s fekalnimi odplakami v kateri školjke rastejo oziroma se nabirajo. V fekalnih odplakah je prisotno veliko virusov.
- Za preprečevanje okužb morajo biti ukrepi usmerjeni v zagotavljanje dobrega higienskega standarda kot je urejeno odstranjevanje odplak in odpadkov, urejeni vodovodni viri, oskrbovalni sistemi ter urejena gojišča školjk v čistih morskih območjih.
- Školjke filtrirajo vodo v kateri živijo, zato je koncentracija mikroorganizmov v sami školjki višja kot v sami vodi. Uporabljati se mora čista voda brez škodljivih mikroorganizmov in toksičnih snovi (npr. toksični plankton), kateri škoduje ne samo potrošniku ampak tudi vodnim organizmom.

SPLOŠNA PRIPOROČILA ZA PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE V DISTRIBUCIJSKI VERIGI ŠKOLJK

- Zagotavljanje primerne števila opremljenih sanitarnih enot na kraju dela.
- Ljudje, ki rokujejo z živili, morajo uporabljati izključno sanitarne enote in ne smejo opravljati potreb v zato ne namenjenih prostorih.
- Sanitarije morajo biti zgrajene, nameščene in vzdrževane tako, da človeške odplake ne pridejo v stik vodo, ki se uporablja za pridelovanje ali predelovanje školjk.
- Ljudje, ki rokujejo z živili, morajo biti ustrezno poučeni o pomenu higiene, vključno s pomembnostjo umivanja rok.
- Ljudje, ki rokujejo s školjkami si morajo umivati roke vedno pred začetkom dela, pogosto med delom in takoj po uporabi stranišča.
- Uporabljena oprema in pribor morata biti čista in narejena iz materialov, ki dopuščajo vse postopke čiščenja in po potrebi tudi dezinfekcije.

SPLOŠNA PRIPOROČILA ZA PREPREČEVANJE OKUŽB ŠKOLJK Z VIRUSI V ŽIVILSKO/OSKRBOVALNI/PREHRANSKI VERIGI

- Školjke se v času od izlova do uporabe shranjuje v hladilniku ali v drugem hladnem in temnem prostoru, kjer zdržijo žive nekaj dni.
- Školjka ob izlovu zapre lupini, ki jo ščitita pred zunanjimi vplivi in izgubo tekočin.
- Pri školjkah ki se prodajajo žive, morajo biti mišici in drugi organi nespremenjene barve, čvrstosti in vonja.
- Nov in HAV lahko preživijo v školjkah več tednov, zato je omogočena sledljivost bistvenega pomena. Na prodajnem mestu morajo školjke imeti vidno oznako, na kateri je podan kraj proizvodnje, proizvajalec, veterinarska številka in datum proizvodnje. Poleg tega naj bi označbe na deklaraciji tudi seznanjale potrošnika, da so školjke živilo visokega tveganja in da neprimerna toplotna obdelava oz. surove lahko povzročijo okužbe z virusi.
- Pri nakupu moramo biti pozorni, da so školjke žive, dobro oprane, njihove lupine morajo biti cele in čiste, na njih ne sme biti blata, peska ali večje rastlinske obrasti.
- Za pripravo jedi morajo biti školjke žive, zato jih praviloma tudi ne shranjujemo v zamrzovalniku.
- Žive školjke imajo večinoma trdno zaprte ali rahlo razprte lupine, ki se morajo ob dotiku zapreti. V kolikor se razprte lupine tudi ob nekoliko močnejšem dotiku ne zaprejo, so školjke mrtve in jih moramo zavreči. Zavremo tudi vse, ki ostanejo zaprte po kuhanju.
- Ukrepi so usmerjeni predvsem v zagotavljanje dobre osebne higiene in izvajanje načel dobrih higienskih navad pri pripravi živil. Med to spada temeljito in pogosto umivanje rok pred in po rokovanju z živili ter predvsem po uporabi toalet, temeljita obdelava školjk pred uživanjem, redno čiščenje toaletnih prostorov, čiščenje površin, ki se jih pogosto dotikamo ter vse osebe, ki kažejo znake bolezni ne smejo rokovati z živili.

- Toplotna obdelala 85-90°C za vsaj 90 s uniči viruse.

6. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁵

Menimo, da smo zastavljene cilje programa v večjem delu izpolnili.

Implementirali smo kemijski metodi za ugotavljanje PSP in DSP toksinov, ter jih uspeli akreditirati pri Slovenski Akreditacijski službi: <http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/katalogsi-lp.htm> LP-021 (številka laboratorija)

V klapavicah iz slovenskih školjčič smo ugotavljali prisotnost norovirusne ribonukleinske kisline. Najmanjši odstotek kontaminiranosti klapavic smo ugotovili v Seči (11,1 %), nekoliko več na Debelem rtiču (21,4 %) in v Strunjanu (24,1 %). Delež kontaminiranih je bil največji v zimskih mesecih.

Z oligonukleotidnimi začetniki ki nalegajo na stiku ORF1-ORF2 (Kageyama in sod., 2003), smo norovirusno RNA ugotovili pri največjem številu vzorcev, saj je ta del norovirusnega genoma tudi najbolj ohranjen (Katayama in sod., 2002), medtem ko smo s klasično metodo RT-PCR in oligonukleotidnimi začetniki, ki nalegajo v polimerazni regiji (Vennema in sod., 2002) ugotovili le manjši delež kontaminiranih klapavic.

Zaradi dolgotrajnega postopka pri vpeljavi novih kemičnih metod detekcije biotoksinov (kar je bil tudi eden glavnih ciljev projekta), nismo mogli ponoviti analiz lipofilnih toksinov na novih vzorcih celic *Dinophysis* oz. izboljšati metode priprave vzorca.

V bodoče je potrebno pri karakterizaciji toksinov upoštevati vse potencialno toksične dinoflagelate, ki proizvajajo lipofilne toksine, ne le tiste iz rodu *Dinophysis*. To še posebej velja za vrsto *Lingulodinium polyedrum*, ki sintetizira jesotoksine in ki so eden pomembnejših povzročiteljev toksičnosti školjk v vzhodnem delu Jadrana, vključno z Istro (kemične analize iz slovenskih školjčič v 2012; v Ninčević Gladan et al., 2010).

Na podlagi biomarkerjev smo opredelili splošno stanje klapavic vzgojenih na slovenskih školjčičih, ki nam bodo služili za oceno zdravstvenega stanja klapavic, zato lahko rečemo, da je bil ta cilj realiziran.

Pripravili smo tudi smernice za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi.

7. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁶

--

8. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁷

Znanstveni dosežek		
1.	COBISS ID	2606159 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO / ANG Evaluation of metallothioneins in blue mussel (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) as a biomarker of mercury and cadmium exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): a long-term field study
	Opis	SLO / ANG In order to assess the spatial distribution and temporal trends of pollution with metals in the coastal sea of Slovenia, the level of metallothioneins (MT) was determined in blue mussels from three sampling locations ... with metals in the coastal sea of Slovenia, the level of metallothioneins (MT) was determined in blue mussels from three sampling locations ...
		Institut za oceanografijo i ribarstvo; Acta Adriatica; 2012; Vol. 53, št. 1; str. 71-86; Impact Factor: 0.500; Srednja vrednost revije / Medium

	Objavljeno v		Category Impact Factor: 1.672; WoS: PI; Avtorji / Authors: Ramšak Andreja, Ščančar Janez, Horvat Milena	
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID		25254951	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	/	
		ANG	Mytilus Galloprovincialis as an indicator of environmental pollution along NE Coast of Adriatic	
	Opis	SLO	/	
		ANG	/	
	Objavljeno v		MEDCOAST; [Proceedings of the] Tenth International Conference on the Mediterranean Coastal Environment, 25-29 October 2011, Rhodes, Greece; 2011; Str. 591-602; Avtorji / Authors: Osterc Andrej, Kanduč Tjaša, Šlejkovec Zdenka, Stibilj Vekoslava, Ramšak Andreja	
3.	COBISS ID		3943032	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	/	
		ANG	Compliance of proposed Codex Alimentarius Guidelines for virus management with principles of good practice	
	Opis	SLO	/	
		ANG	/	
	Objavljeno v		Akadémiai K.; Acta alimentaria; 2011; Vol. 40, no. 3; str. 364-375; Impact Factor: 0.444; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.379; WoS: JY, SA; Avtorji / Authors: Ambrožič Mateja, Božič Tina, Jevšnik Mojca, Cook Nigel, Raspor Peter	
4.	COBISS ID		3440250	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Norovirusi pri klapavicah (Mytilus galloprovincialis) v slovenskem morju	
		ANG	Detection of noroviruses in Mytilus galloprovincialis in Slovenia	
	Opis	SLO	/	
		ANG	/	
	Objavljeno v		Veterinarska fakulteta; Program in zbornik referatov; Slovenian veterinary research; 2011; Vol. 48, suppl. 13; str. 94-97; Impact Factor: 0.216; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.951; WoS: ZC; Avtorji / Authors: Henigman Urška, Biasizzo Majda, Grebenc Stanka, Kirbiš Andrej, Toplak Ivan, Gombač Mitja, Steyer Andrej, Barlič-Maganja Darja	
	Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	

9. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁸

Družbenoekonomsko relevantni dosežki				
1.	COBISS ID		2606159	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	/	
		ANG	Evaluation of metallothioneins in blue mussel (Mytilus galloprovincialis) as a biomarker of mercury and cadmium exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): a long-term field study	
			In order to assess the spatial distribution and temporal trends of pollution	

	Opis	SLO	with metals in the coastal sea of Slovenia, the level of metallothioneins (MT)was determinated in blue mussels from three sampling locations ...	
		ANG	/	
	Šifra	F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin		
	Objavljeno v	Institut za oceanografiju i ribarstvo; Acta Adriatica; 2012; Vol. 53, št. 1; str. 71-86; Impact Factor: 0.500;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.672; WoS: PI; Avtorji / Authors: Ramšak Andreja, Ščančar Janez, Horvat Milena		
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	3440250		Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Norovirusi pri klapavicah (Mytilus galloprovincialis) v slovenskem morju	
		ANG	/	
	Opis	SLO	/	
		ANG	/	
	Šifra	F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin		
	Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; Program in zbornik referatov; Slovenian veterinary research; 2011; Vol. 48, suppl. 13; str. 94-97; Impact Factor: 0.216;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.951; WoS: ZC; Avtorji / Authors: Henigman Urška, Biasizzo Majda, Grebenc Stanka, Kirbiš Andrej, Toplak Ivan, Gombač Mitja, Steyer Andrej, Barlič-Maganja Darja		
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci		

10. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁹

HENIGMAN, Urška. Ugotavljanje patogenih bakterij in virusov v školjkah slovenskega morja in njihova genetska karakterizacija : doktorska disertacija = Detection of pathogenic bacteria and viruses in mussels from Slovenian coastal waters and their genetic characterization : doctoral thesis. Ljubljana: [U. Henigman], 2012. 179 str., ilustr., tabele. [COBISS.SI-ID 3527546]

Diplomska dela (bolonjski študij 1. stopnje):

HAMACHER, Loretta. Biomarkers of environmental pollution measured in *Mytilus galloprovincialis* : report. Leverkusen: [Hamacher, L.], 2011. 20 str., ilustr. [COBISS.SI-ID 2558799]

DOMAZET Danijela. Odziv biomarkerjev splošnega stresa v klapavicah (*Mytilus galloprovincialis*). Zaključna naloga, 2012, Univerza na primorskem, FAMNIT, 57 str. ilustr.

11. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine¹⁰

11.1. Pomen za razvoj znanosti¹¹

SLO

Uvedba, validacija in akreditacija metod za ugotavljanje DSP n PSP toksinov pomeni pomemben prispevek k izboljšanju analitike na področju detekcije morskih biotoksinov. Z vpeljavo metod se je pomembno razširil spekter toksinov, ki jih lahko določimo in sicer ne le v školjkah, ampak tudi v dinoflagelatih, ki so povzročitelji nastanka morskih biotoksinov. Vpeljani metodi omogočata nadaljnje moderne raziskave na tem področju.

Vpeljava RT-PCR metode za ugotavljanje prisotnosti norovirusov v školjkah bo pripomogla k spremljanju pojavljanja in določanja stopnje kontaminacije z norovirusi v školjkah. Pridobljeno znanje bo pripomoglo k razvoju novih metod za ugotavljanje drugih virusov, npr. virusa

hepatitisa E.

Razvoj inovativnih metod za ugotavljanje stresa v školjkah omogoča opredeljevanje zdravstvenega stanja školjk; gre za prvi tovrstni metodi v našem prostoru.

Z izdelavo smernic za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi smo doprinesli uvajanju dobrih praks v proizvodnih procesih.

ANG

Implementation, validation and accreditation of methods for detection of DSP and PSP toxins is an important contribution to laboratory analyses of marine biotoxins. The implemented methods have greatly broadened the range of toxins we are able to detect, not only in shellfish, but also in dinoflagellates, which are the biotoxins source. These methods will enable further state-of-the-art research in this field.

Implementation of RT-PCR for detection of noroviruses in shellfish will improve monitoring of viral contamination of shellfish. Experience gained in its implementation will be valuable in development of new methods for detection of other viruses, such as hepatitis E virus.

Innovative methods for assessment of stress levels in shellfish are the first of their kind in Slovenia and enable monitoring of the shellfish' health state. Development of guidelines for prevention of viral contamination of shellfish will contribute to good practice development in manufacturing processes.

11.2. Pomen za razvoj Slovenije¹²

SLO

Implementirane in akreditirane metode za ugotavljanje morskih biotoksinov so referenčne metode, predpisane v EU zakonodaji in jih bomo lahko uporabili za preiskave, ki so del državnega monitoringa. Z uvedbo metode za ugotavljanje norovirusov smo pripravljeni ob sprejemu evropske zakonodaje na takojšnje delo. Ugotavljanje morskih biotoksinov v dinoflagelatih bo lahko v prihodnje pripomoglo k ugotavljanju njihovega pojavljanja v slovenskem morju. Smernice za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi bodo služile v postopkih uvajanja dobrih praks v proizvodnem procesu proizvajalcev, gostinskih obratov in tudi pri potrošnikih.

Razvoj in implementacija metod izboljšuje konkurenčnost institucij za nadzor živil živalskega izvora na nivoju EU.

Z razvojem in uvedbo metod in izdelavo smernic smo prispevali k boljšemu stanju na področju veterinarskega javnega zdravja, ki zajema tudi nadzor nad živilom živalskega izvora. Na ta način bodo rezultati analiz hitrejši, natančnejši in cenejši, kar pomeni da bo lahko tudi odziv ustreznih nadzornih organov učinkovitejši.

ANG

Implemented and accredited methods for the detection of marine biotoxins are the reference methods prescribed by the EU law and can be used for the analyses which are included in the national official sampling program. With the introduction of methods for the determination of noroviruses, we are prepared for the requirements of the coming European law. Determination of marine biotoxins in dinoflagellates will contribute to their detection and more rapid responses during dinoflagellate outbreaks. Guidelines for prevention of shellfish contamination will serve in introducing best practices in the production process, catering facilities and education of consumers.

Development and implementation of methods for detection of biotoxins and noroviruses have improved competitiveness of the institutions responsible for control of food of animal origin at the EU level. Results of analyses will be more accurate, available faster and at lower costs, which means that Slovenian supervisory bodies will be able to respond faster and more efficiently. Together with the construction of the above mentioned guidelines, results of the project offer an important contribution to the field of veterinary public health, which includes control of food of animal origin.

12. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine.

12.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

☒ v domačih znanstvenih krogih

☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹³

Interes po naših spoznanjih oziroma rezultatih kažejo predvsem proizvajalci školjk.

12.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

☒ v mednarodnih znanstvenih krogih

☒ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹⁴

Centro Ricerche Marine v Cesenatico, NRL Italija
EU-RL for marine biotoxins, Vigo, Španija

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹⁵

Uspešno sodelovanja v medlaboratorijskih kontrolah in poskus prijave mednarodnega projekta skupaj z Centro Ricerche Marine v Cesenatico, NRL Italija.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino letnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi študijo ali elaborat, skladno z zahtevami sofinancerjev

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Andrej Kirbiš

ŽIG

Kraj in datum: Ljubljana, 10.10.2012 10.10.2012

Oznaka prijave: ARRS-CRP-ZP-2012-05/43

¹ Zaradi spremembe klasifikacije je potrebno v poročilu opredeliti raziskovalno področje po novi klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Podpisano izjavo sofinancerja/sofinancerjev, s katero potrjuje/jo, da delo na projektu potekalo skladno s programom, skupaj z vsebinsko obrazložitvijo o potencialnih učinkih rezultatov projekta obvezno priložite obrazcu kot priponko (v skeniranem PDF formatu) in jo v primeru, da poročilo ni polno digitalno podpisano, pošljite po pošti na Javno agencijo za raziskovalno dejavnost RS. [Nazaj](#)

Zaključno poročilo o rezultatih ciljnega raziskovalnega projekta - 2012

³ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

⁴ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

⁶ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁷ Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁸ Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbenoekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen, kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno ekonomsko relevantnega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. v preteklem letu vodja meni, da je izjemen dosežek to, da sta se dva mlajša sodelavca zaposlila v gospodarstvu na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovila svoje podjetje, ki je rezultat prejšnjega dela ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁹ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹³ Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

¹⁴ Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

¹⁵ Največ 1.000 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2012-05 v1.00c
7F-E0-9F-30-E3-80-A6-28-41-5F-43-80-7C-50-1D-C1-C9-9A-39-8E

Predstavitev raziskovalnih hipotez

Školjke so živilo, ki je vedno pogostejše na krožniku slovenskega potrošnika. V Sloveniji imamo tri registrirana školjčičišča, Seča, Strunjan ter Debeli rtič, kjer se letno pridela cca. 250 ton užitnih klapavic.

Evropska zakonodaja natančno opredeljuje zahteve glede zdravstvene ustreznosti školjk. Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 854/2004 o določitvi posebnih predpisov za organizacijo uradnega nadzora proizvodov živalskega izvora, namenjenih za prehrano ljudi ter uredba št. 853/2004 o posebnih higienskih pravilih za živila živalskega izvora opredeljujeta zdravstvene standarde in uradni nadzor glede zdravstvene ustreznosti školjk.

Zadnjih nekaj let je tudi velik poudarek na ugotavljanju prisotnosti virusov v školjkah, vendar ta trenutek to področje še ni regulirano z evropsko zakonodajo.

V RS ugotavljamo vsebnost dinoflagelatov v morski vodi od leta 1994, medtem, ko se ugotavlja nekatere morske biotoksine v školjkah, diaroične (DSP) in paralitične (PSP) od leta 1993.

V letu 2006, ko je stopila v veljavo evropska zakonodaja, se je bilo potrebno prilagoditi in razširiti analitiko ugotavljanja morskih biotoksinov. Zakonsko je predpisano ugotavljanje DSP, PSP ter amnezjskih toksinov (ASP).

Uredba ES 2074/2006 natančno predpisuje uporabo referenčnih metod za ugotavljanje morskih biotoksinov, kjer je poleg biološkega poskusa na miših v primeru PSP toksinov tudi kemijska metoda HPLC, t.i. Lawrencova metoda. Za ugotavljanje DSP toksinov, je med trajanjem projekta vstopila v veljavo uredba komisije 15/2011, ki predpisuje kot referenčno metodo kemijsko metodo LC-MS/MS, ki je natančnejša, predvsem pa selektivnejša, saj lahko natančno določimo skupine toksinov in njihove metabolite.

V sklopu projekta je bil namen vpeljati Lawrencovo metodo za ugotavljanje PSP toksinov, kakor tudi LC-MS/MS metodo za ugotavljanje lipofilnih toksinov. Obe metodi naj bi validirali in akreditirali, tako da bosta uporabni za kontrolo uradnih vzorcev državnega monitoringa, kar je zahtevano s strani EU.

V okviru vzorčevanj monitoringa toksičnega fitoplanktona smo nameravali izolirati posamezne vrste dinoflagelatov, ki proizvajajo različne toksine iz velike skupine lipofilnih toksinov za njihovo identifikacijo, vendar ne z biološkimi, pač pa z analitskimi kemičnimi metodami kot je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. V primeru, da bi se pokazala časovna spremenljivost v vsebnosti toksinov, bi skušali ugotoviti in to opredeliti z ekološkega vidika. Ovrednotiti smo tudi želeli odzivnost in uporabnost gena p53/63 v klapavicah kot novega molekularno genetskega markerja genotoksičnosti.

Norovirusi se pojavljajo sezonsko z epidemičnim vrhom v hladnih mesecih. Sezonsko pojavljanje je prisotno tudi v primeru izbruhov v ustanovah (bolnišnicah, domovih starejših občanov in zaporih) in primerih povezanih s kontaminirano hrano.

Človeški norovirusi se pojavljajo v školjkah zaradi fekalnega onesnaženja, sicer se ne razmnožujejo v školjkah, se pa koncentrirajo iz kontaminirane vode. Zaradi nevarnosti prenosljivih bolezni povezanih z uživanjem školjk je večina držav sprejela sanitarne ukrepe.

Za zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti školjk je rutinsko v uporabi ugotavljanje prisotnosti fekalnih bakterij, vendar pa so se pojavili pri ljudeh

gastroenteritisi, katerih vzrok so bile školjke, ki so ustrezale Evropskim predpisom o prisotnosti fekalnih bakterij.

V sklopu projekta smo nameravali razviti in vpeljati molekularne metode za dokazovanje norovirusov v školjkah in jih testirati na vzorcih slovenskih školjčič, tipizirati dokazane viruse ter izdelati smernice za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi.

Material in metode

DSP toksini

Uporabili smo ustrezen certificiran referenčni material za DSP toksine v školjkah in certificirane referenčne standarde za OA, YTX, PTX-2, AZA-1, AZA-2, AZA-3, GYM, SPX-1.

Razvili smo metodo za določanje lipofilnih toksinov:

- Izbira analitske kolone

Uporabili smo kolon XBridge 5m, C18, 2.1 x 50.0 mm, (Waters, Part.No.186003085) v kombinaciji s predkolono XBridge 5m, C18, 2.1 x 10.0 mm, (Waters, Part.No.186003056).

- Izbira mobilne faze in gradienta:

Mobilna faza: Component A: Amonijak v H₂O

Component B: Amonijaka v 90% ACN

Gradientno mešanje:

čas (min)	%A	%B	Krivulja
0	80	20	1
6	30	70	6
8	30	70	6
8,5	80	20	6
14,0	80	20	6

- Izbira ostalih parametrov za tekočinsko kromatografijo:

Pretok mobilne faze: 0,3 ml/min

Injekcijski volumen: 15 µL

Temperatura termostata za kolono in predkolono: 40.0 °C

Temperatura vzorcev: 5.0°C

Čas snemanja kromatograma: 14 min

- Izbira ionskih prehodov in MS parametrov:

Function 1

Retention window (mins): 0.0 – 6.0

Ion mode: ES-

Function type: MRM of 16 mass pairs

	Transition	Cone Voltage
(V)	Collision Energy (eV)	

YTX	570.5 > 396.4	75	40	
YTX	570.5 > 467.4	75	40	
OA	803.0 > 113.1	60	50	
OA	803.0 > 225.2	60	45	
DTX2	803.0 > 113.1	60	50	
DTX2	803.0 > 225.2	60	45	
DTX1	817.0 > 113.1	60	50	
DTX1	817.0 > 225.2	60	45	
YTX	1141.5 > 855.4	40	55	
YTX	1141.5 > 1061.5	40	40	
homo-YTX	1155.5 > 869.5	40	55	
homo-YTX	1155.5 > 1075.5	40	40	
45-OH-YTX	1157.5 > 871.7	40	55	
45-OH-YTX	1157.5 > 1077.7	40	40	
45-OH-homo-YTX	1171.5 > 869.5	40	55	
45-OH-homo-YTX	1171.5 > 1091.5	40	40	

Function 2

Retention window (mins): 5.5 – 14.0

Ion mode: ES+

Function type: MRM of 14 mass pairs

	Transition	Cone Voltage	
(V)	Collision Energy (eV)		
GYM	508.2 > 162.2	50	45
GYM	508.2 > 490.2	50	25
SPX1	692.5 > 164.2	40	50
SPX1	692.5 > 674.4	40	30
AZA3	828.5 > 792.5	35	40
AZA3	828.5 > 810.5	35	30
AZA1	842.2 > 806.3	35	40
AZA1	842.2 > 824.3	35	30
AZA2	856.5 > 820.5	35	30
AZA2	856.5 > 838.5	35	30
PTX2	876.3 > 213.1	40	30
PTX2	876.3 > 823.1	40	22
PTX1	892.5 > 821.5	40	30
PTX1	892.5 > 213.1	40	30

• Izvedba ekstrakcije toksinov iz vzorca za določanje prostih toksinov

• Izvedba hidrolize vzorca za določanje celokupnih OA in DTX toksinov

Validirali smo presejalno metodo za določanje lipofilnih toksinov na nivoju 0,2 maksimalne dovoljene vrednosti lipofilnih toksinov v školjkah: 32 µg/kg za OA, PTX-2, AZA-1, GYM in SPY-1 ter 200 µg/kg za YTX.

Delovanje metode smo preskusili na slepem vzorcu školjk s standardnim dodatkom LBT na različnih koncentracijskih nivojih.

PSP toksini

Uporabili smo ustrezne certificirane referenčne materiale in pripravili standardne raztopine. Kromatografsko metodo smo preskusili na različnih HPLC kolonah po oksidaciji standardnih raztopin. Izpeljali smo dve različni oksidaciji. Za identifikacijo toksinov STX, dc STX, GTX2,3, dc GTX2,3, GTX5, C1,2 s fluorescenčnim detektorjem je potrebna oksidacija standardnih raztopin toksinov in vzorcev s peroksidnim reagentom. Za določanje NeO in GTX 1,4 toksina s fluorescenčnim detektorjem pa je potrebno izpeljati oksidacijo s perjodnim reagentom.

Kot najustreznejša se je pokazala kolona Supelcosil LC-ABZ 5 μ (Supelco, 150 x 4,6 mm, 4 μ m) s predkolono s C-18 polnilom DB. Mobilna faza je raztopina 0,1 M amonijev format s pH 6 z in brez 5 % MeCN.

Delovanje metode smo preskusili na vzorcu obogatenih školjk, za katerega smo vedeli katere in koliko PSP toksinov vsebuje. Na vzorcu smo preskusili celoten postopek od ekstrakcije in čiščenja na SPE trdni fazi C18, oksidacije ekstraktov, do kromatografske določitve. Pripravili smo tudi vzorce, ki smo jih sami obogatili na 1/10 in 1/2 najvišje dovoljene vrednosti (MRL), ki znaša 800 μ g/kg.

Norovirusi

Izolacijo RNA smo izvajali iz prebavnih žlez klapavic, ki smo jih homogenizirali z gojiščem MEM v razmerju 1:2. Iz tako pripravljene suspenzije smo odvzeli alikvot in izolirali RNA s komercialnim kompletom RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Virusno RNA smo dokazovali z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). Z začetnima oligonukleotidoma JV12Y in JV13I smo pomnoževali odsek gena RdRp. Za pomnoževanje nukleinske kisline v eni stopnji smo uporabili reagente in encime SuperScriptTMOneStep RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, Nemčija). Rezultate smo interpretirali na podlagi specifične velikosti produktov (326 bp) z elektroforezo v 1,8 % agaro- znem gelu. Specifičnost produktov smo potrdili še z direktnim določanjem nukleotidnega zaporedja. Pri desetih vzorcih so bili produkti sekvenčne reakcije čista zaporedja, le - te smo tudi shranili v genski bazi (GenBank) pod oznakami JN040477 - JN040486, pri ostalih so se nekateri deli nukleotidnih zaporedij prekrivali.

Fitoplanktonske preiskave

Na izoliranih celicah toksičnih vrst dinoflagelatov (*Dinophysis caudata*, *D. fortii*, *D. tripos*) in na naravnih - mešanih fitoplanktonskih vzorcih so bile opravljen prve analize o vsebnosti lipofilnih toksinov z uporabo LC-MS/MS metode.

V okviru projekta smo na novo vpeljali dve metodi, ki nam omogočata ugotavljati stres v klapavicah. Prva metoda je ugotavljanje sposobnosti razgradnje v lizosomih in je učinkovita za ugotavljanje splošnega stresa. Zaradi poškodb v membrani lizosomov je okvarjeno delovanje encimskega sistema v lizosomih in tudi povečana prepustnost lizosomalnih membran. Druga metoda omogoča ugotavljanje genotoksičnih učinkov v jedru hemocit v klapavicah (mikronukleusni test). Zaradi delovanja genotoksičnih snovi pride do poškodb DNA in do napak pri delitvi kromosomov. Oba testa se uporabljata pri opredelitvi zdravstvenega stanja klapavic in sta tudi standardizirana in priporočena za biomonitoring (ICES, 2011 in Bolognesi in Fenech, 2012). Oba testa smo uporabili na klapavicah, vzgojene v školjčičih ob slovenski obali.

Rezultati

Vpeljali smo metodo za ugotavljanje PSP toksinov. Kromatografsko metodo smo preskusili na različnih HPLC kolonah po oksidaciji standardnih raztopin. Kot najustreznejša se je pokazala kolona Supelcosil LC-ABZ 5 μ (Supelco, 150 x 4,6 mm, 4 μ m) s predkolono s C-18 polnilom DB. Mobilna faza je raztopina 0,1 M amonijev format s pH 6 z in brez 5 % MeCN. Delovanje metode smo preskusili na vzorcu obogatenih školjk, za katerega smo vedeli katere in koliko PSP toksinov vsebuje. Na vzorcu smo preskusili celoten postopek od ekstrakcije in čiščenja na SPE trdni fazi C18, oksidacije ekstraktov, do kromatografske določitve. Pripravili smo tudi vzorce, ki smo jih sami obogatili na 1/10 in 1 najvišje dovoljene vrednosti (MRL), ki znaša 800 μ g/kg. Pripravili smo standardni operacijski postopek za določanje PSP toksinov v školjkah s kemijsko metodo, ki se zdaj lahko uporablja kot nova referenčna presejalna metoda. Opravili smo osnovno validacijo, ki je potrebna za postavitve referenčne presejalne metode za določanje PSP toksinov s kemijsko metodo. Sledile so kemijske analize vzorcev školjk na PSP toksine, ki so potekale vzporedno z obstoječo referenčno biološko metodo. Rezultati primerjave novo vpeljane kemijske metode in biološkega poskusa so pokazali, da je metoda dobro vpeljana in primerna za rutinsko kemijsko presejalno metodo določanja PSP toksinov v školjkah. Metoda je bila akreditirana s strani SLOVENSKE AKREDITACIJE dne 23.4.2012. Potrditev akreditacije je na linku: <http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/katalogsi-lp.htm> ; številka laboratorija: LP-021

Vpeljali smo metodo za določanje lipofilnih toksinov. Napisali smo standardiziran operativni postopek (SOP) za opisano metodo, po katerem bo delo potekalo v bodoče. Izvedli smo validacijo presejalne metode za določanje lipofilnih toksinov na nivoju 0,2 maksimalne dovoljene vrednosti lipofilnih toksinov v školjkah: 32 μ g/kg za OA, PTX-2, AZA-1, GYM in SPY-1 ter 200 μ g/kg za YTX. Delovanje metode smo preskusili na slepem vzorcu školjk s standardnim dodatkom LBT na različnih koncentracijskih nivojih. Izvedli smo kemijsko analize LBT v vzorcih školjk, ki so bile vzorčene za monitoring v letu 2010 in 2011. Rezultate smo primerjali z rezultati biološkega poskusa v tem obdobju. Metoda je bila s strani SLOVENSKE AKREDITACIJE akreditirana dne 23.4.2012. Potrditev akreditacije je na linku: <http://www.slo-akreditacija.si/teksti-1/slo/katalogsi-lp.htm> ; številka laboratorija: LP-021

V obdobju od januarja 2010 do marca 2012 smo na prisotnost norovirusne nukleinske kisline pregledali 70 vzorcev klapavic (*Mytilus galloprovincialis*). Školjke so

bile vzorčene v treh slovenskih školjčičih: v Seči, Strunjanu in na Debelem rtiču tekom celega leta 2010 in 2011, le v letu 2012 je bilo vzorčenje le do meseca marca. Z metodo RT-PCR v realnem času smo norovirusno RNA ugotovili v 13 od skupno 70 vzorcev (18,6 %). Dokazani norovirusi so pripadali obema genskima skupinama – I in II. Pri dveh smo ugotovili noroviruse obeh genskih skupin, v 11 vzorcih le gensko skupino II.

Leta 2010 smo pri testiranju 35 vzorcev školjk norovirusno RNA dokazali v šestih vzorcih. Pri štirih vzorcih je bila ugotovljena genska skupina II, vzorca, v katerih smo ugotovili obe genski skupini pa sta bila dva.

Leta 2011 smo testirali 27 vzorcev školjk in pri šestih dokazali norovirusno nukleinsko kislino, ugotovljena je bila le genska skupina II

Leta 2012 smo testirali le osem vzorcev in pri enem dokazali gensko skupino II.

Po posameznih školjčičih so bili rezultati sledeči:

V letu 2010 smo pri klapavicah vzorčenih v Strunjanu ugotovili norovirusno RNA pri štirih od skupno 12 vzorcev (33,3 %), pri dveh od skupno 9 z Debelega rtiča (22,2 %), le pri vzorcih iz Seče je med preiskanimi 14 nismo ugotovili.

Leta 2011 je bila norovirusna RNA prisotna pri dveh od skupno 12 vzorcev iz Strunjana (16,6 %), pri treh od 10 iz Seče (30,0 %) in pri enem od petih z Debelega rtiča (20,0 %).

Pri klapavicah, ki so bile vzorčene v obdobju med januarjem in marcem 2012 smo norovirusno RNA ugotovili pri enem od petih vzorčenj iz Strunjana (20,0 %).

V zadnji fazi projekta smo realizirali zastavljene cilje projekta v okviru fitoplanktonskih raziskav. Na izoliranih celicah toksičnih vrst dinoflagelatov (*Dinophysis caudata*, *D. fortii*, *D. tripos*) in na naravnih - mešanih fitoplanktonskih vzorcih so bile opravljeni prve analize o vsebnosti lipofilnih toksinov z uporabo LC-MS/MS metode. Rezultati so potrdili vsebnost nekaterih lipofilnih toksinov v naravnih vzorcih fitoplanktona v času največje abundance toksičnih dinoflagelatov (september 2010; podatki pridobljeni iz nacionalnega monitoringa MKO/VURS o nadzoru morske vode na slovenskih školjčičih), ne pa tudi v izolatih posameznih vrst. To narekuje potrebo po nadaljnjih raziskavah, saj ni bila dokazana sinteza lipofilnih toksinov na izbranih vrstah iz rodu *Dinophysis*. Hkrati tudi še ne moremo natančneje opredeliti sezonskega pojavljanja določenih lipofilnih toksinov gleda na sezonsko pojavljanje vrst *Dinophysis*.

Članek z naslovom "Preliminary study on vertical migrations of dinoflagellates in a dynamic coastal sea (Gulf of Trieste, northern Adriatic)" avtoric J. Francé in P. Mozetič je bil sprejet v objavo v reviji *Acta Adriatica*. Članek obravnava nekatere ekološke značilnosti dinoflagelatov, med drugim tudi toksičnih vrst in se tako v širšem smislu navezuje na vsebino CRP projekta.

Članek z naslovom "Toksičnost gojenih klapavic in zapore njihove prodaje v povezavi s pojavljanjem toksičnega fitoplanktona v slovenskem morju" avtorjev Francé, Mozetič, Obal, Kirbiš je v zaključni fazi pisanja in obravnava analizo medletnih variacij abundance *Dinophysis* spp. na slovenskih gojiščih školjk. Avtorji so izpostavili razlike v abundancah v letih, ko abundanca ni odstopala od dolgoletnega povprečja in v letu 2010, ki je bilo glede tega izjemno - tako po abundanci osebkov *Dinophysis* spp., kot po trajanju toksičnosti školjk in posledično prepovedi prodaje.

V okviru projekta smo na novo vpeljali dve metodi, ki nam omogočata ugotavljanje stres v klapavicah. Prva metoda je ugotavljanje sposobnosti razgradnje v lizosomih in

je učinkovita za ugotavljanje splošnega stresa. Zaradi poškodb v membrani lizosomov je okvarjeno delovanje encimskega sistema v lizosomih in tudi povečana prepustnost lizosomalnih membran. Druga metoda omogoča ugotavljanje genotoksičnih učinkov v jedru hemocit v klapavicah (mikronukleusni test). Zaradi delovanja genotoksičnih snovi pride do poškodb DNA in do napak pri delitvi kromosov. Oba testa se uporabljata pri opredelitvi zdravstvenega stanja klapavic in sta tudi standardizirana in priporočena za biomonitoring (ICES, 2011 in Bolognesi in Fenech, 2012).

Oba testa smo uporabili na klapavicah, vzgojene v školjčičih ob slovenski obali. Ugotovili smo, da lizosomi zadržijo barvilo nevtralnno rdeče 20 do 30 minut, medtem ko je frekvenca mikronukleusov v razponu od 1,5 do 5,5 %.

Izdelali smo smernice za preprečevanje kontaminacije školjk z virusi

Nosilci živilske dejavnosti so zavezani k zagotavljanju in izvajanju ustreznih dobrih navad (praks), ki so potrebne za preprečevanje okužb z mikroorganizmi, med njimi tudi virusi. Živila se z virusi lahko okužijo že v fazi pridelave, lahko pa do okužbe pride naknadno pri obdelavi, predelavi, distribuciji kakor tudi v domači kuhinji. V ta namen je treba opraviti redno usposabljanje o higieni živil za vse zaposlene, ki rokujejo z živili. Usposabljanje mora biti dokumentirano in preverljivo. Nosilci živilske dejavnosti so dolžni tudi približati načela dobre gospodinjske prakse potrošnikom z namenom preprečevanja zdravstvenih posledic, ki jih povzročajo okužbe z virusi zaradi podaljševanja verige »od polja do mize« ter čedalje pogostejšega uživanja živil, katerih pred zaužitjem ni potrebno toplotno obdelati.

ČEMU?

- Virusi so zelo majhni, preprosti organizmi, ki se razmnožujejo v živih celicah. So pomembni povzročitelji bolezni, ki se prenašajo tudi z živili, izvirajo pa lahko od človeka ali okolja v katerem se živilo nahaja.
- Virusi pogosto povzročajo bolezni pri ljudeh in živalih.
- Virusi lahko povzročijo bolezenska stanja kot so driska, bruhanje in celo hepatitis.
- Pogost povzročitelj izbruhov z virusi so školjke ter sveže sadje in zelenjava še posebej jagodičevje ter listnata zelenjava.
- Smernice bodo pripomogle k izboljššanemu preprečevanju tveganj okužb školjk z virusi vzdolž celotne verige od vil do vilic. Poleg tega je potrebno v HACCP sistemih tudi upoštevati viruse kot enega izmed možnih tveganj.

KJE SE LAHKO VIRUSI NAHAJAJO

- V fekalno onesnaženi vodi v kateri rastejo školjke.
- V človeških in živalskih iztrebkih.
- Na rokah in oblačilih okuženih ljudi, ki rokujejo z živili.
- Na površinah uporabljene opreme.
- V toaletnih prostorih, katere uporabljajo ljudje, ki rokujejo z živili, vključno s stranišči, umivalniki za roke in s kljukami na vratih.

ZAKAJ RAVNO ŠKOLJKE?

- Školjke so živilo, ki je vedno pogostejše na krožniku tako evropskega kot tudi slovenskega potrošnika.
- Obolenja povezana z zaužitjem školjk so poznan in razširjen pojav, saj se školjke pogosto uživa surove ali nezadostno toplotno obdelane.
- Školjke se prehranjujejo s planktonom, ki ga prefiltrirajo iz vode in tako lahko koncentrirajo tudi virusne delce v fekalno onesnaženi vodi kot so virus Hepatitisa A (HAV) in norovirusi (NoV).
- V naravi živijo školjke pritrjene na trdno podlago v pasu plime in oseke, kjer najdejo ustrezne življenjske pogoje. Gojene školjke živijo v gojiščih imenovanih školjčičih, pritrjene na gojitvene vrvi in mrežice, ki so obešene na plavajočih plovkah. Lokacije proizvodnih območij so glede izpolnjevanja zdravstvenih pogojev razdeljena v:
 - območje A, iz katerih se nabirajo školjke za neposredno prehrano ljudi
 - območje B v katerih se naberejo žive školjke, vendar so za prehrano ljudi primerne šele po obdelavi v centru za prečiščevanje ali pa po ponovni nasaditvi.
 - Območje C, v katerih se naberejo žive školjke, vendar so za prehrano ljudi primerne šele po ponovni nasaditvi za dolgo obdobje,

SPLOŠNA PRIPOROČILA ZA PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE Z VIRUSI V ŠKOLJČIŠČU

- Školjke se najpogostejše okužijo preko vode okužene s fekalnimi odplakami v kateri školjke rastejo oziroma se nabirajo. V fekalnih odplakah je prisotno veliko virusov.
- Za preprečevanje okužb morajo biti ukrepi usmerjeni v zagotavljanje dobrega higienskega standarda kot je urejeno odstranjevanje odplak in odpadkov, urejeni vodovodni viri, oskrbovalni sistemi ter urejena gojišča školjk v čistih morskih območjih.
- Školjke filtrirajo vodo v kateri živijo, zato je koncentracija mikroorganizmov v sami školjki višja kot v sami vodi. Uporabljati se mora čista voda brez škodljivih mikroorganizmov in toksičnih snovi (npr. toksični plankton), kateri škoduje ne samo potrošniku ampak tudi vodnim organizmom.

SPLOŠNA PRIPOROČILA ZA PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE V DISTRIBUCIJSKI VERIGI ŠKOLJK

- Zagotavljanje primerne števila opremljenih sanitarnih enot na kraju dela.
- Ljudje, ki rokujejo z živili, morajo uporabljati izključno sanitarne enote in ne smejo opravljati potreb v zato ne namenjenih prostorih.
- Sanitarije morajo biti zgrajene, nameščene in vzdrževane tako, da človeške odplake ne pridejo v stik vodo, ki se uporablja za pridelovanje ali predelovanje školjk.
- Ljudje, ki rokujejo z živili, morajo biti ustrezno poučeni o pomenu higiene, vključno s pomembnostjo umivanja rok.
- Ljudje, ki rokujejo s školjkami si morajo umivati roke vedno pred začetkom dela, pogosto med delom in takoj po uporabi stranišča.
- Uporabljena oprema in pribor morata biti čista in narejena iz materialov, ki dopuščajo vse postopke čiščenja in po potrebi tudi dezinfekcije.

SPLOŠNA PRIPOROČILA ZA PREPREČEVANJE OKUŽB ŠKOLJK Z VIRUSI V ŽIVILSKO/OSKRBOVALNI/PREHRANSKI VERIGI

- Školjke se v času od izlova do uporabe shranjuje v hladilniku ali v drugem hladnem in temnem prostoru, kjer zdržijo žive nekaj dni.
- Školjka ob izlovu zapre lupini, ki jo ščitita pred zunanjimi vplivi in izgubo tekočin.
- Pri školjkah ki se prodajajo žive, morajo biti mišici in drugi organi nespremenjene barve, čvrstosti in vonja.
- Nov in HAV lahko preživijo v školjkah več tednov, zato je omogočena sledljivost bistvenega pomena. Na prodajnem mestu morajo školjke imeti vidno oznako, na kateri je podan kraj proizvodnje, proizvajalec, veterinarska številka in datum proizvodnje. Poleg tega naj bi označbe na deklaraciji tudi seznanjale potrošnika, da so školjke živilo visokega tveganja in da neprimerna toplotna obdelava oz. surove lahko povzročijo okužbe z virusi.
- Pri nakupu moramo biti pozorni, da so školjke žive, dobro oprane, njihove lupine morajo biti cele in čiste, na njih ne sme biti blata, peska ali večje rastlinske obrasti.
- Za pripravo jedi morajo biti školjke žive, zato jih praviloma tudi ne shranjujemo v zamrzovalniku.
- Žive školjke imajo večinoma trdno zaprte ali rahlo razprte lupine, ki se morajo ob dotiku zapreti. V kolikor se razprte lupine tudi ob nekoliko močnejšem dotiku ne zaprejo, so školjke mrtve in jih moramo zavreči. Zavržemo tudi vse, ki ostanejo zaprte po kuhanju.
- Ukrepi so usmerjeni predvsem v zagotavljanje dobre osebne higiene in izvajanje načel dobrih higienskih navad pri pripravi živil. Med to spada temeljito in pogosto umivanje rok pred in po rokovanju z živili ter predvsem po uporabi toalet, temeljita obdelava školjk pred uživanjem, redno čiščenje toaletnih prostorov, čiščenje površin, ki se jih pogosto dotikamo ter vse osebe, ki kažejo znake bolezni ne smejo rokovati z živili.
- Toplotna obdelala 85-90°C za vsaj 90 s uniči viruse.