

Klasa: 541-01/16-01/13

Uredžbeni broj: 2-16-1

U Osijeku, 05. prosinca 2016.

Profil rizika

od norovirusa u zelenom lisnatom povrću u HR

Donositelj Profila rizika (sukladno članku 7. st. 3. ovoga Pravilnika)

Usvojeno 31. svibnja 2017.

U izradi sudjelovale:

Vlatka Buzjak-Služek, dipl. ing., Hrvatska agencija za hranu

Ivana Plavšin, mag. biol., Hrvatska agencija za hranu

Dr. sc. Ines Škoko, dr. med. vet., Hrvatski veterinarski institut, Vet. zavod Split

Dr. sc. Brigita Hengl, dr. med. vet., Hrvatska agencija za hranu

Sažetak

Norovirusi se danas smatraju najvažnijim uzročnikom nebakterijskog gastroenteritisa u svijetu. Rod *Norovirus* obuhvaća genetički vrlo raznoliku skupinu virusa koji pripadaju različitim genogrupama. Do danas je ustanovljeno postojanje 6 genogrupa norovirusa od kojih su 3 infektivne za čovjeka, a najčešći uzročnik bolesti u ljudi pripada soju GII.4 virusa. Simptomi bolesti obično se pojavljuju 48 sati nakon izlaganja virusu, a karakterizirani su vodenastim proljevom bez tragova krvi, i povraćanjem.

Zahvaljujući visokoj otpornosti na okolišne uvjete kao i otpornosti na većinu često korištenih sredstava za dezinfekciju te niskoj infekcijskoj dozi, norovirusi se mogu prenositi na različite načine. Primarni način prenošenja norovirusa, nakon izbijanja gastroenteritisa, je fekalno-oralnim putem. Obično se prenose direktno, kontaktom sa zaraženom osobom, a mogu se prenositi i indirektnim putevima – konzumacijom kontaminirane hrane i vode ili kontaktom s kontaminiranim površinama.

Do kontaminacije hrane norovirusom može doći u bilo kojem koraku proizvodnje, pa tako i pri samoj manipulaciji hranom od strane osoba koje su zaražene, a ukoliko se ta hrana nakon rukovanja neće podvrći dovoljnoj toplinskoj obradi. Najčešći, i možda najbolje istraženi, izvori zaraze norovirusom su školjkaši, jagode, lisnato zeleno povrće i voda. Kontaminirana voda predstavlja izravnu opasnost od norovirusa ukoliko se koristi za piće, ali značajnu opasnost predstavlja i ako se koristi za navodnjavanje usjeva ili prilikom prerade i pripremanja hrane. Također, radnici mogu direktnim kontaktom prenijeti virus na hranu, a najčešće je to slučaj ako su zaraženi ili asimptomatski kliconoše.

Kako bi se smanjio rizik od kontaminacije norovirusom, uz izbjegavanje uporabe kontaminirane vode u svim fazama lanca opskrbe hranom, nužna je usklađenost sa zahtjevima higijene, posebno higijene ruku osoba koje rukuju hranom. Implementacija postojećih preventivnih programa kao što su dobra poljoprivredna praksa, dobra proizvođačka praksa i dobra higijenska praksa trebaju biti primarni cilj poljoprivrednika. Njihovom implementacijom duž cijelog prehrambenog lanca „od polja do stola“ moguće je kontrolirati čitav niz mikrobioloških opasnosti.

Hrvatska agencija za hranu je provela istraživanje u kojem su uzorci svježe zelene salate (zapakirana i nezapakirana) analizirani na prisutnost norovirusa genogrupa GI i GII. Rezultati analiza pokazali su da niti u jednom od 50 uzoraka zelene salate koja se nalazila na tržištu Hrvatske nije utvrđena prisutnost norovirusa. S obzirom na rezultate kontaminiranosti zelenog lisnatog povrća i službeno prijavljenog broja ljudi oboljelih od bolesti uzrokovanih norovirusom, rizik od norovirusa iz zelenog lisnatog povrća u RH može se smatrati zanemarivim.

Ključne riječi: norovirus, hrana, salata, preventivne mjere, kontaminacija.

Abstract

Noroviruses are nowadays considered one of the most important cause of nonbacterial gastroenteritis in the world. Norovirus genus includes genetically highly diverse group of viruses which belong to different genogroups. To date, 6 norovirus genogroups are discovered, three of which are infectious for humans. GII.4 strain of norovirus predominate among human infections. Symptoms of the disease usually appear

48 hours after exposure to the virus, and are characterized by watery diarrhea, with no traces of blood, and vomiting.

Due to the high resistance to environmental conditions, resistance to most commonly used disinfectants and low infectious dose, noroviruses can be transmitted through a variety of modes. The primary mode of transmission, after the outbreak of gastroenteritis, is the fecal-oral route. Noroviruses are usually transmitted directly by contact with an infected person, but they can be transmitted by indirect pathways as well. Indirect pathways include ingestion of contaminated food or water, and contact with contaminated surfaces.

Contamination of food with norovirus can occur at any stage of production, including manipulation of food by infected persons in case when food will not undergo sufficient heat treatment afterwards. The most common, and perhaps the best investigated, sources of infection norovirus are shellfish, strawberries, leafy greens and water. Contaminated water represents a direct risk of norovirus infection if used for drinking, or represents a significant danger if used for irrigation of crops or during processing and preparing food. Also, food handlers can transmit the virus through direct contact with food. This is usually the case with infected people or asymptomatic carriers.

In order to reduce the risk of norovirus contamination, it is necessary to avoid the use of contaminated water at all stages of the food supply chain. Also, it is necessary to comply with the hygiene requirements, especially hand hygiene and hygiene of food handlers. The implementation of existing prevention programs, such as good agricultural practices, good manufacturing practices and good hygiene practice, should be the primary objective of farmers. By implementation of above mentioned programs along the entire food chain it is possible to control a range of different microbiological hazards. Croatian Food Agency carried out a study in which samples of fresh lettuce (packaged and unpackaged) were analyzed for the presence of GI and GII genogroups of norovirus. The results showed that none of the 50 samples of lettuce, present on the Croatian market, was contaminated by norovirus. Considering the results of contamination of green leafy vegetables and officially registered number of people suffering from diseases caused by norovirus, the risk of norovirus from green leafy vegetables in Croatia can be considered negligible.

Keywords: norovirus, food, lettuce, prevention, contamination.

Sadržaj

Sažetak.....	1
Abstract	1
Sadržaj	3
Uvod	4
1. Morfologija norovirusa	6
1.1. Prenošenje virusa	7
2. Simptomi bolesti	8
3. Kontaminacija hrane	8
3.1. Rangiranje rizika od norovirusa iz hrane	9
3.2. Zeleno lisnato povrće	10
4. Istraživanje prisutnosti NoV u svježoj salati na tržištu RH	10
4.1. Analitička metoda.....	10
4.2. Rezultati istraživanja	11
5. Smanjivanje kontaminacije povrća norovirusom	11
6. Rizik od norovirusa iz zelenog lisnatog povrća	12
Literatura.....	12

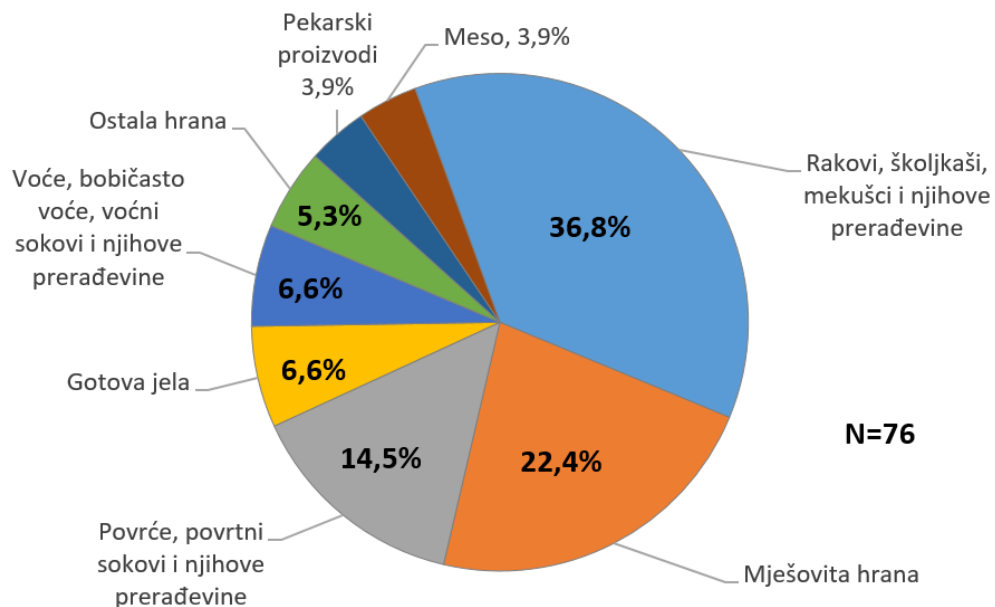
Uvod

Prema zajedničkom izvješću Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) i Europskog centra za sprečavanje i kontrolu bolesti (ECDC) o trendovima i izvorima zoonoza, uzročnika zoonoza i epidemijama porijeklom iz hrane u 2014. godini, u EU je prijavljeno ukupno 5 251 epidemija porijeklom iz hrane (uključujući i bolesti koje se prenose vodom). Virus su uzrok najvećeg broja prijavljenih epidemija (20,4 %) te su nadmašili salmonele (20,0 %) kao najčešći uzrok. Norovirusi se danas smatraju najvažnijim uzročnikom nebakterijskog gastroenteritisa u svijetu (Acheson, 2009; Atmar i Estes, 2006; DiCaprio i sur., 2013).

Broj epidemija porijeklom iz hrane uzrokovanih virusima u EU varirao je u periodu od 2008. do 2014. godine. Nakon vrhunca 2009. kad su prijavljene 1 043 epidemije, broj prijava se smanjivao do 2011. godine, ali je u 2014. godini, kada je dosegnut najveći broj prijava do sad, više nego udvostručen (od 525 prijava 2011. do 1 072 prijave 2014.).

U 2014. godini, od ukupnog broja prijavljenih epidemija porijeklom iz hrane uzrokovanih virusima (ne uzimajući u obzir bolesti koje se prenose vodom), samo kod 84 epidemije (7,6 % s ukupno 3 654 oboljela) postoje čvrsti dokazi koji povezuju bolest kod ljudi i hranu kao izvor.

Norovirus je najčešće prijavljivani virus kod epidemija za koje postoje čvrsti dokazi koji povezuju bolest kod ljudi i hranu kao izvor (76 epidemija od 84 ukupno) što obuhvaća 97,6 % prijavljenih slučajeva oboljenja (3 565 oboljenja) (Slika 1). U preostalim 345 epidemija koje se povezuju s norovirusom ne postoje čvrsti dokazi.

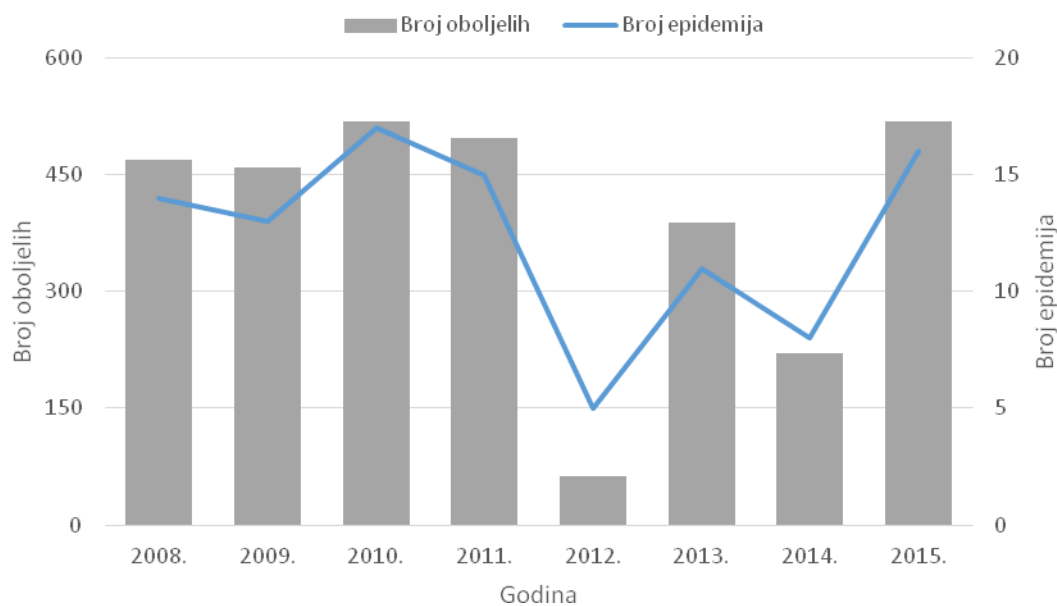


Slika 1. Vrste hrane povezane s epidemijama uzrokovanim norovirusom u slučaju čvrste evidencije u EU u 2014. godini (EFSA i ECD, 2015).

Tipična vrsta hrane vezana uz epidemije norovirusa je nedovoljno kuhana morska hrana te voće i povrće (Tuan Zainazor i sur., 2010). Mnogo vrsta voća (npr. maline, jagode) i salata prepoznati su kao sredstvo prenošenja norovirusa (Ethelberg i sur., 2010; Schmid i sur., 2007; Tuan Zainazor i sur., 2010).

Smatra se kako je vjerojatno zbog blagih simptoma i samolimitirajućeg karaktera bolesti broj prijavljenih slučajeva znatno manji od realnog broja oboljenja. Istraživanje provedeno u Velikoj Britaniji pokazuje da tek 4 % oboljelih potraži pomoć obiteljskog liječnika (Tam i sur., 2012).

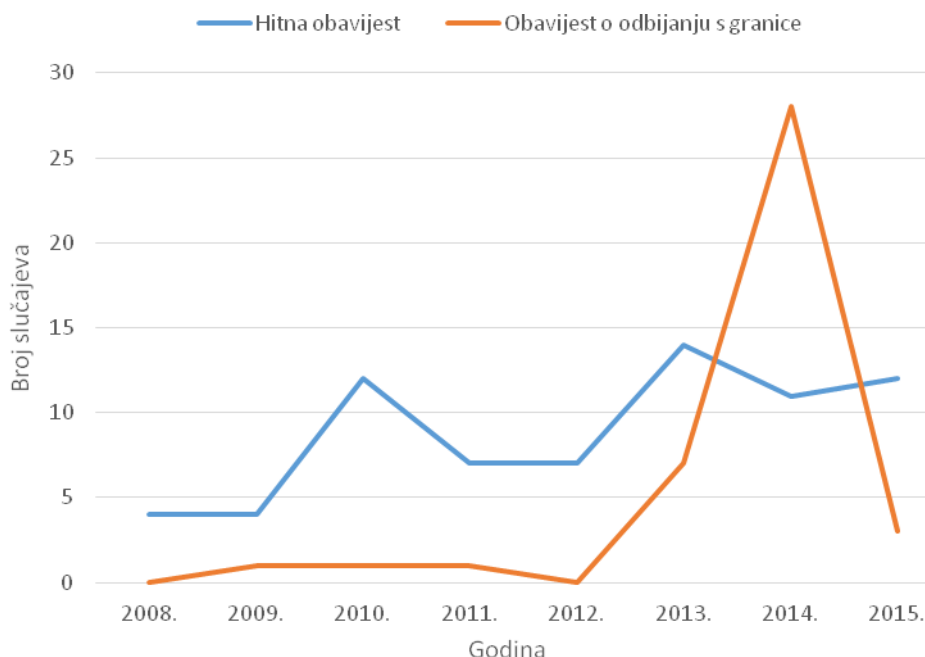
Prema podacima iz Epidemioloških vjesnika, u Hrvatskoj je u razdoblju od 2008. do 2015. godine prijavljeno 98 epidemija uzrokovanih norovirusom, što je obuhvatilo 3 122 slučaja oboljenja kod ljudi (**Slika 2**). Najveći broj epidemija te broj oboljelih zabilježen je 2010. godine. Nakon razdoblja relativno konstantnog broja epidemija uzrokovanih norovirusom i broja oboljelih (2008. – 2011.), 2012. godine zabilježen je značajan pad, kako broja epidemija tako i broja oboljelih. Godina 2014. također se može istaknuti kao jedna od godina s manjim brojem epidemija i brojem oboljelih. Nakon 2014., u 2015. godini nastavio se trend porasta broja epidemija i broja oboljelih koji su gotovo dosegli brojke iz 2010. godine.



Slika 2. Broj epidemija i slučajeva oboljenja u Hrvatskoj kod ljudi po godinama u razdoblju 2008. – 2015. godine.

Putem sustava brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF), u razdoblju od 2008. do 2015. godine, zaprimljena je 41 hitna obavijest i 71 obavijest o odbijanju s granice, a koje se tiču prisustva norovirusa u hrani za ljude (**Slika 3**). Gledajući navedeno razdoblje, može se reći da broj zaprimljenih hitnih obavijesti pokazuje blagi trend porasta. Najviše hitnih obavijesti zaprimljeno je 2013., a nešto manji broj 2010. i 2015. godine. Najmanji broj hitnih obavijesti evidentiran je tijekom 2011. i 2012. godine. S obavijestima o odbijanju s granice situacija je nešto drugačija. Nakon razdoblja stagnacije (2008. – 2012.), 2013. dolazi do naglog porasta broja obavijesti što se nastavlja i tijekom 2014. godine kada je zaprimljen najveći broj obavijesti o odbijanju s granice. To se povezuje s povećanim brojem

zaprimljenih obavijesti zbog norovirusa prisutnog u školjkašima porijeklom iz Vijetnama, što je posljedica kontaminacije obalne vode norovirusima (European Commission, 2015). No, već 2015. dolazi do značajnog pada broja zaprimljenih obavijesti.



Slika 3. Broj hitnih obavijesti i obavijesti o odbijanju s granice u RASFF sustavu po godinama u razdoblju 2008. – 2015. godine.

1. Morfologija norovirusa

Norovirus (NoV), ranije nazvan Norwalk virus, kasnije preimenovan u „virus male okrugle strukture“, a 2002. prema međunarodnom komitetu za taksonomiju virusa (ICTVdB, 2004) nazvan je norovirus. Pet je rodova unutar obitelji *Caliciviridae*: *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Vesivirus* i *Sapovirus*, a svaki predstavlja različitu genetsku skupinu (Thorne i Goodfellow, 2014). Norovirusi su prvi put opisani 1972. godine nakon velike epidemije u Norwalku, Ohio. Pripadnici ovog roda su uglavnom mali, okrugli virusi, promjera od 27 do 38 nm. Sadrže pozitivno orijentiranu jednolančanu RNA okruženu vrlo stabilnim proteinskim omotačem, ali ne posjeduju vanjsku lipoproteinsku ovojnicu (DiCaprio i sur., 2013; Goulter-Thorsen i Jaykus, 2014).

Rod *Norovirus* obuhvaća genetički vrlo raznoliku skupinu virusa koji pripadaju različitim genogrupama. Do danas je ustanovljeno postojanje 6 genogrupa norovirusa (GI – GVI) koji sadrže više od 30 genotipova virusa, a rasprostranjeni su diljem svijeta. Od 6 poznatih genogrupa norovirusa, 3 su infektivne za čovjeka (GI, GII i GIV), a najčešći uzročnik bolesti u ljudi pripada soju GII.4 virusa (Barclay i sur., 2014; Bosch i sur., 2016; Maunula i Bonsdorf, 2016; Zheng i sur., 2006).

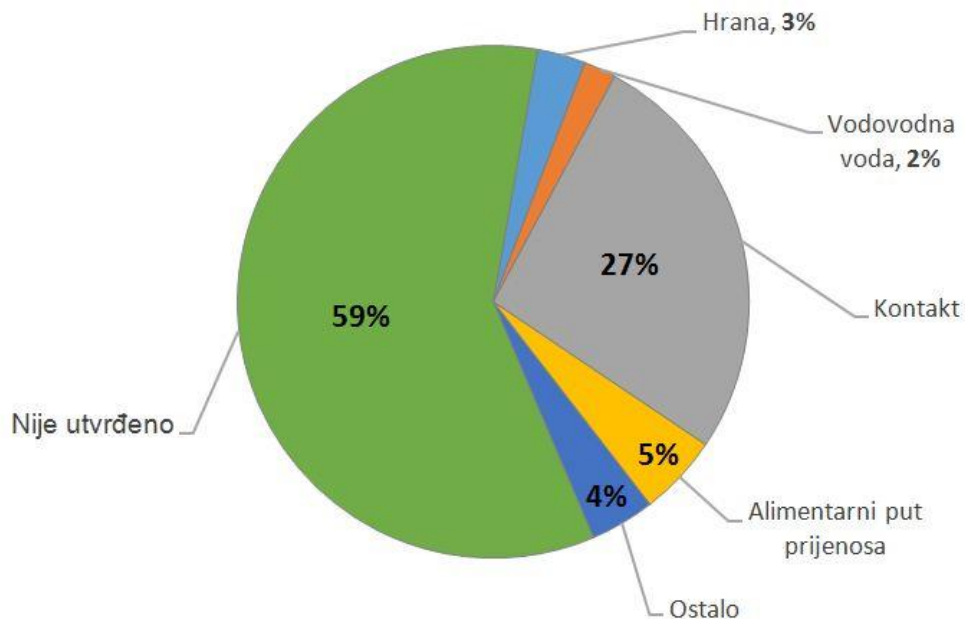
Infekcijska doza za noroviruse je vrlo niska, svega 10 – 100 virusnih čestica (Bresee i sur., 2002), a u stolici se izlučuje čak 10^8 – 10^{12} kopija/g (Atmar i sur., 2008). Virus na kontaminiranim površinama ostaje

infektivan do 2 tjedna, dok u vodi zadržava infektivnost i do 2 mjeseca budući da je otporan na koncentraciju klora prisutnu u vodovodnoj vodi (Kalyoussef i Feja, 2014). Vrlo su stabilni u okolišu i otporni na mnoge često korištene dezinficijense, kao što su sredstva za dezinfekciju na bazi alkohola i fenola, zatim na temperature do 60°C i zamrzavanje, te kiseline i lužine (Acheson, 2009).

1.1. Prenošenje virusa

Zahvaljujući visokoj otpornosti na okolišne uvjete kao i otpornosti na većinu često korištenih sredstava za dezinfekciju te niskoj infekcijskoj dozi, norovirusi se mogu prenositi na različite načine. Primarni način prenošenja norovirusa, nakon izbijanja gastroenteritisa, je fekalno-oralnim putem (Shieh i sur. 2000). Obično se prenose direktno, kontaktom sa zaraženom osobom, a mogu se prenositi i indirektnim putevima – konzumacijom kontaminirane hrane i vode ili kontaktom s kontaminiranim površinama (Barclay i sur., 2014; DiCaprio i sur., 2013). Osim toga, dokazano je da tijekom povraćanja oboljele osobe nastaje aerosol koji može sadržavati virus u infekcijskoj dozi što također predstavlja izvor kontaminacije za druge osobe ili hranu, prostor i predmete (Barclay i sur., 2014; Prato i sur., 2004).

Kao što je već ranije spomenuto, prema podacima iz Epidemioloških vjesnika, u Hrvatskoj je u razdoblju od 2008. do 2015. godine utvrđeno 98 epidemija uzrokovanih norovirusom. U većini službeno prijavljenih slučajeva (59 %) izvor zaraze nije utvrđen. Prijenos kontaktom utvrđen je u 27 % slučajeva, dok je u 5 % slučajeva utvrđen alimentarni put prijenosa. Zaraza putem vodovodne vode zabilježena je u 2 %, a putem hrane u svega 3 % slučajeva (Slika 4).



Slika 4. Učestalost pojava epidemija prema različitim izvorima norovirusa u Hrvatskoj u razdoblju od 2008. do 2015. godine.

2. Simptomi bolesti

Za oboljenje koje nastaje kao posljedica infekcije norovirusima koriste se različiti termini, kao što su virusni gastroenteritis, akutni nebakterijski gastroenteritis, otrovanje hranom, infekcija hranom i „gripa želuca“.

Norovirusi su glavni uzročnici akutnog gastroenteritisa u ljudi svih dobnih skupina, iako su češće pogođeni stariji ljudi i djeca. Vrijeme inkubacije za norovirus iznosi od 10 do 51 h (Cook i Richards, 2013). Simptomi bolesti obično se pojavljuju 48 sati nakon izlaganja virusu, a karakterizirani su vodenastim proljevom bez tragova krvi, i povraćanjem. Povraćanje je karakterističnije za djecu do jedne godine starosti, dok je pojava proljeva češća kod starije djece i odraslih (DiCaprio, 2013; Hall i sur., 2013). Osim toga, mogu biti prisutni i abdominalni grčevi, groznica, mučnina, glavobolja, a posljedično dolazi i do dehidracije.

Bolest je obično samolimitirajuća, bez dugotrajnih posljedica, iako kod djece, starijih ljudi i imunokompromitiranih osoba bolest može potrajati i dulje (Belliot i sur., 2014). Dojenčad i manja djeca nakon infekcije NoV mogu razviti ozbiljan gastroenteritis sa simptomima koji ponekad mogu trajati i do 6 tjedana (Kirkwood i Streitberg, 2008). Stopa mortaliteta od norovirusnog gastroenteritisa je vrlo niska, svega 0,1 % (Goulter-Thorsen i Jaykus, 2014).

Inficirane osobe potencijalni su prenositelji virusa na druge osobe. Subklinička infekcija je česta, utvrđena u trećine eksperimentalno inficiranih osoba (Graham i sur., 1994). Kako jedna trećina inficiranih ne ispoljava nikakve simptome bolesti može doći do značajnog, iako nenamjernog, širenja bolesti (DiCaprio, 2013; Hutson i sur., 2004). Uzročnik bolesti prisutan je u povraćanom sadržaju i stolici oboljelih. Izlučivanje uzročnika u stolici počinje i prije pojave prvih simptoma, a u najvišem je titru 4 dana nakon infekcije. Kod odraslih osoba izlučivanje uzročnika obično traje do 3 tjedna, dok kod asimptomatskih kliconoša izlučivanje uzročnika može trajati i dulje. Kod imunokompromitiranih osoba izlučivanje norovirusa može potrajati i do nekoliko mjeseci.

Budući da osoba razvija imunitet koji može trajati samo nekoliko mjeseci, a imunost je specifična za pojedini soj, moguće je oboljeti ponovno nakon 2-3 godine, odnosno više puta u životu (Atmar, 2010).

Epidemije uzrokovane norovirusom česte su na krstarenjima, u restoranima, staračkim domovima, bolnicama, dječjim vrtićima, školama i drugim institucijama gdje se hrana zajednički poslužuje. Pojava bolesti nije uvjetovana sezonski, iako se veći broj slučajeva prijavljuje tijekom zimskih mjeseci (DiCaprio i sur., 2013; Kalyoussef i Feja, 2014).

3. Kontaminacija hrane

Norovirus se često prenosi hranom, do čije kontaminacije može doći u bilo kojem koraku proizvodnje (Atmar, 2010; Koopmans i Duizer, 2004), pa tako i pri samoj manipulaciji hranom od strane osoba koje su zaražene, a ukoliko se ta hrana nakon rukovanja neće podvrći dovoljnoj toplinskoj obradi (Koopmans i Duizer, 2004).

Najčešći, i možda najbolje istraženi, izvori zaraze norovirusom su školjkaši, jagode, lisnato zeleno povrće i voda, što je dosad i bilo zabilježeno u epidemijama norovirusnog gastroenteritisa, premda se ponekad izvor i ne može otkriti (Goodgame, 2001; Svraka i sur., 2007).

Do kontaminacije vode (rijeka, jezera, obalnih voda) najčešće dolazi zbog onečišćenja nedovoljno pročišćenim otpadnim vodama ili vodom iz kanalizacije. Takva voda predstavlja izravnu opasnost od

norovirusa ukoliko se koristi za piće, ali značajnu opasnost predstavlja i ako se koristi za navodnjavanje usjeva ili prilikom prerade i pripremanja hrane (Cook i Richards, 2013; Matthews i sur., 2012).

Budući da je virus otporan na koncentraciju klora prisutnu u vodovodnoj vodi, širenje bolesti moguće je i putem kontaminirane vode iz javnog vodovoda, te vodom iz bunara i bazena, najčešće uslijed fekalne kontaminacije. Norovirusi se navode kao glavni uzročnik bolesti koje se prenose vodom u svijetu (Cook i Richards, 2013).

Školjkaši uzgajani u vodi u kojoj je ustanovljeno fekalno onečišćenje, s obzirom da se hrane filtriranjem velike količine vode, predstavljaju opasnost od zaraze norovirusom koji se u školjkašima može naći u značajnoj koncentraciji zbog procesa bioakumulacije (Bosch i sur., 2001; Le Guyader i sur., 2003; Škoko i sur., 2010). Kamenice nisu samo pasivni filtratori već i selektivno akumuliraju NoV specifičnim vezanjem na ugljikohidratne glikane (osobito tip A-like HBGA) (Le Guyader i sur., 2006; Tian i sur., 2006).

U slučaju prenošenja norovirusa putem gotove hrane, najčešće do kontaminacije dolazi zbog loših higijenskih uvjeta i neprimjerenog rukovanja hranom osoba koje izlučuju virus. NoV infekcija se jako brzo širi i zbog postojanja asimptomatski inficiranih osoba koje izlučuju virus, te zbog dugotrajnog izlučivanja virusa jer je dokazano da osobe mogu izlučivati virus 3 do 8 tjedana nakon preboljenja (Atmar i sur., 2008; Hutson i sur., 2004).

Iako je mogućnost kontaminacije hrane moguća u svakom koraku proizvodnje hrane, najčešće do nje dolazi prilikom pripreme i posluživanja hrane. Zbog toga je nastanak epidemija uzrokovanih norovirusom najčešći na mjestima gdje se većem broju ljudi poslužuje gotova hrana. Kontaminaciji norovirusom podložniji su proizvodi kojima se rukuje u više navrata, kao što su pekarski proizvodi. Piletina, svinjetina, govedina i njihove prerađevine, te mliječni proizvodi (sir) također su česti izvori zaraze norovirusom iako do njihove kontaminacije najčešće dolazi nakon doticaja s drugom kontaminiranom namirnicom (križna kontaminacija) (Cook i Richards, 2013).

Lisnato povrće, bobičasto voće (svježe ili smrznuto) i školjkaši, koji se uglavnom konzumiraju sirovi ili nedovoljno termički obrađeni, najčešće se navode kao izvori zaraze norovirusom putem hrane (Barclay i sur., 2014).

3.1. Rangiranje rizika od norovirusa iz hrane

EFSA-in Znanstveni odbor za biološke opasnosti (BIOHAZ) razvio je model koji obuhvaća više kriterija, za rangiranje rizika kod kombinacija pojedine hrane i specifičnih patogena s ciljem identifikacije i rangiranja specifičnih kombinacija hrana/patogen koje su najčešće povezane s pojavom oboljenja kod ljudi, a uzrokovanih hranom neživotinjskog porijekla. U modelu su koristili sedam kriterija: jačina povezanosti između hrane i patogena, incidencija bolesti, posljedice bolesti, odnos doza-odgovor, konzumacija, prevalencija kontaminacije i potencijal rasta patogena za vrijeme roka uporabe hrane. Na osnovi spomenutih kriterija definirali su pet grupa hrana/patogen (padajućim nizom) koji predstavljaju najveći rizik, te su u treću grupu svrstali kombinaciju norovirus/lisnato zeleno povrće koje se jede sirovo kao salata; u četvrtu grupu norovirus i lukovičasto povrće, norovirus i maline; a u petu norovirus i rajčica te norovirus i mrkva (EFSA, 2013).

3.2. Zeleno lisnato povrće

U primarnoj proizvodnji najveći faktori rizika za kontaminaciju zelenog lisnatog povrća norovirusom su okolišni čimbenici, ponajviše klimatski uvjeti (npr. obilni pljuskovi ili poplave) koji povećavaju mogućnosti prijenosa norovirusa iz kanalizacije ili otpadnih voda do voda za navodnjavanje ili do polja na kojima se uzgaja zeleno lisnato povrće; zatim, korištenje kontaminirane vode (kanalizacijom ili otpadnim vodama) za navodnjavanje ili pripremu otopine pesticida te kontaminacija od strane radnika ili strojeva za vrijeme branja povrća ili na farmama nakon branja (Cook i Richards, 2013; Da Silva i sur., 2007).

Najveći rizik od kontaminacije norovirusom predstavljaju faze primarne proizvodnje u kojima dolazi do doticaja vode i jestivih dijelova povrća, a to su prskanje prije žetve, izravna primjena gnojiva, prskanje pesticidima (kontaminirana voda koja se koristi u pripremi otopine pesticida) i površinsko navodnjavanje. Manje je rizično podzemno navodnjavanje ili navodnjavanje kapanjem („kap po kap“) kod kojih voda ne dolazi u doticaj s jestivim dijelom biljke (FAO, 2003). U nekim studijama je također dokazano, uz pasivnu kontaminaciju, i specifično vezanje NoV s ugljikohidratima prisutnim u staničnoj stijenci salate (Gao i sur., 2016).

Radnici direktnim kontaktom mogu prenijeti virus na povrće (Gil i sur., 2013), a najčešće je to slučaj ako su zaraženi, asimptomatski kliconoše ili zbog neprovođenja higijene ruku (Todd i sur., 2007). Stoga su osobe koje rukuju s hranom u trgovinama, ugostiteljskim objektima i privatnim kućanstvima glavni faktor rizika kod kontaminacije hrane (EFSA, 2014).

Prerada lisnatog povrća do proizvoda gotovog za konzumaciju najčešće uključuje sljedeće korake: selekciju, uklanjanje vanjskih listova, rezanje, pranje, ispiranje, cijedenje, pakiranje i skladištenje. Najveći faktori rizika tijekom prerade lisnatog povrća su kontaminacija ili križna kontaminacija preko opreme, vode ili radnika. Uranjanje svježe narezanog povrća u tankove za pranje predstavlja rizik od križne kontaminacije vodom koja kruži u tankovima za pranje (EFSA, 2014). Utjecaj klora na inaktivaciju norovirusa nije u potpunosti definiran zbog nedostatka studija o infektivnosti, iako posljednja istraživanja dokazuju da je virus otporan na koncentracije klora koje se uobičajeno koriste za kloriranje vodovodne vode.

Budući da u većini EU zemalja ne postoji redovni monitoring prisutnosti norovirusa u lisnatom povrću, vrlo je malo informacija dostupno o prevalenciji norovirusa u lisnatom povrću (EFSA, 2014).

4. Istraživanje prisutnosti NoV u svježoj salati na tržištu RH

Uzimajući u obzir rizik koji predstavlja norovirus u lisnatom povrću i nedostatak informacija o prevalenciji, Hrvatska agencija za hranu je provela istraživanje u kojem su uzorci svježe zelene salate (zapakirana i nezapakirana) analizirani na prisutnost norovirusa genogrupa GI i GII. Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski Zavod Split obavio je uzorkovanje i analize na ukupno 50 uzoraka zelene salate iz domaće proizvodnje i uvoza, koja se nalazila na tržištu Hrvatske.

4.1. Analitička metoda

Za analizu je korištena metoda ISO/TS 15216-2:2013 (E) – Horizontalna metoda za detekciju Hepatitis A virusa i Norovirusa u hrani primjenom RT-PCR u realnom vremenu; Drugi dio; Metoda dokazivanja. Ta

standardizirana metoda također navodi implementaciju svih mjera kontrole uspješnosti procesa, dodatak procesne kontrole mengovirusa u sve pretraživane uzorke u svrhu evaluacije ekstrakcijske efikasnosti. Primijenjene su oligonukleotidne početnice uz upotrebu specifičnih Taqman proba (Da Silva i sur., 2007; Kageyama i sur., 2003; Loisy i sur., 2005; Svraka i sur., 2007) koje prepoznaju točno određeni amplificirani dio preklapanja ORF1-ORF2, u skladu s ISO/TS 15216-1: 2013 (E) i ISO/TS 15216-2: 2013 (E).

4.2. Rezultati istraživanja

Rezultati analiza pokazali su da niti u jednom od 50 uzoraka zelene salate koja se nalazila na tržištu Hrvatske **nije utvrđena prisutnost norovirusa.**

5. Smanjivanje kontaminacije povrća norovirusom

Na temelju rezultata istraživanja prema kojima se vidi kako nije bio kontaminacije salata norovirusom te u skladu s izvještajem o broju oboljelih ljudi, preporuča se pridržavati određenih mjera kako bi se spriječila i/ili smanjila moguća kontaminacija povrća te spriječio ili smanjio prijenos norovirusa putem kontaminirane hrane.

U proizvodnji povrća poljoprivrednici se trebaju pridržavati slijedećih preventivnih mjera kako bi zadovoljili opća pravila higijene koja propisuje Uredba (EZ) br. 852/2004 Europskog parlamenta i Vijeća o higijeni hrane (EFSA, 2011):

- održavanje čistoće i, gdje je potrebno nakon čišćenja, provođenje dezinfekcije objekata, opreme, kontejnera, sanduka, vozila i posuda,
- osiguranje higijenskih uvjeta proizvodnje, transporta i skladištenja proizvoda,
- korištenje pitke ili čiste vode kako bi se spriječila kontaminacija,
- osiguranje da je osoblje koje rukuje s hranom zdravo i da su prošli edukaciju o rizicima za zdravlje,
- sprječavanje životinja i štetočina da uzrokuju kontaminaciju,
- skladištenje i rukovanje otpadom i opasnim tvarima na način kako bi se spriječila kontaminacija,
- uzimanje u obzir rezultata relevantnih analiza provedenih na uzorcima biljaka ili drugih uzoraka koji su bitni za zdravlje ljudi,
- dobra poljoprivredna praksa (engl. *good agricultural practice* - GAP),
- dobra proizvođačka praksa (engl. *good manufacture practice* - GMP),
- HACCP plan.

Implementacija postojećih preventivnih programa kao što su dobra poljoprivredna praksa, dobra proizvođačka praksa i dobra higijenska praksa (engl. *good hygiene practice* - GHP) trebaju biti primarni

cilj poljoprivrednika. Njihovom implementacijom duž cijelog prehrambenog lanca „od polja do stola“ moguće je kontrolirati čitav niz mikrobioloških opasnosti (EFSA, 2014).

Kako bi se smanjio rizik od kontaminacije norovirusom, uz izbjegavanje uporabe kontaminirane vode u svim fazama lanca opskrbe hranom, nužna je usklađenost sa zahtjevima higijene, posebno higijene ruku osoba koje rukuju hranom (EFSA, 2014). Franck i suradnici (2015) ljudima koji rukuju s hranom preporučuju izbjegavanje kontakta s hranom i u slučajevima kada netko u kućanstvu boluje od akutnog gastroenteritisa.

Na proizvodnim područjima potrebno je procijeniti opasnosti koje mogu utjecati na higijenu i sigurnost hrane, posebice identificirati potencijalne izvore fekalne kontaminacije. Ukoliko se tijekom procjene zaključi da je kontaminacija u određenom području na razinama koje mogu, npr. u slučaju obilnih kiša i poplava, ugroziti sigurnost usjeva, potrebno je intervenirati kako bi se ograničilo korištenja tog zemljišta za primarnu proizvodnju dok se opasnosti ukloni. Svako proizvodno područje (polje ili staklenik) potrebno je zasebno procijeniti jer predstavlja jedinstvenu kombinaciju brojnih čimbenika koji mogu utjecati na pojavu i otpornost patogena. Među mogućim intervencijama, za sprječavanje dodatnog širenja kontaminirane vode, su tretiranje vode i drenažni sustavi kako bi se uklonio višak vode.

Informacije o postojećim preventivnim mjerama za kontaminaciju norovirusom mogu se naći i u vodiču za kontrolu kontaminacije hrane virusima Codexovog vijeća za higijenu hrane (Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food) (CAC, 2012) i u smjernicama koje su nastale kao rezultat FP7 projekta „Integrirani nadzor i kontrola virusa porijeklom iz hrane u europskom lancu opskrbe hranom“ (CORDIS, 2013).

6. Rizik od norovirusa iz zelenog lisnatog povrća

S obzirom na rezultate kontaminiranosti zelenog lisnatog povrća i službeno prijavljenog broja ljudi oboljelih od bolesti uzrokovanih norovirusom, rizik od norovirusa iz zelenog lisnatog povrća u RH može se smatrati zanemarivim.

Međutim, kako nastanak bolesti nije isključivo posljedica prisutnosti norovirusa u hrani, već i ponašanja svih sudionika u lancu proizvodnje hrane, nužno je primjenjivati dobru higijensku praksu i ustaljene postupke u proizvodnji i distribuciji hrane, kao i u njezinoj pripremi u ugostiteljstvu, ali i vlastitom domaćinstvu.

U skladu s time skrećemo pozornost na provođenje i primjenu preporuka navedenih u odjeljku 5., a posebice na kontinuirano praćenje trendova pojave epidemija uzrokovanih hranom koja sadrži noroviruse u zemljama iz okruženja ili drugih zemalja Europe. Na taj bi se način pravodobno uočili znakovi koji ukazuju na izravnu opasnost od norovirusa i njegovog širenja putem hrane, uključujući i zeleno lisnato povrće.

Literatura

1. Acheson DWK (2009): Food and Waterborne Illnesses. U *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego, SAD.

2. Atmar RL, Estes MK (2006): The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35:275-290.
3. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY (2008): Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging Infectious Diseases*, 14:1553-1557.
4. Atmar RL (2010): Noroviruses – State of the art. *Food and Environmental Virology*, 2:117-126
5. Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinjé J, Lopman B (2014): Infection control for norovirus. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(8):731-40.
6. Belliot G, Lopman BA, Ambert-Balay K, Pothier P (2014): The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 20:724–730.
7. Bosch A, Sanchez G, Le Guyader FS, Vanaclocha H, Haugarreau L, Pinto RM (2001): Human enteric viruses in coquina clams associated with a large Hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology*, 43:61-65.
8. Bosch A, Pinto RM, Guix S (2016): Foodborne viruses. *Current Opinion in Food Science*, 8:110-119.
9. Bresee JS, Widdowson MA, Monroe SS, Glass RI (2002): Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clinical Infectious Diseases*, 35:748-753.
10. CAC, Codex Alimentarius Commission (2012): *Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food*. Codex Committee on Food Hygiene.
11. Cook N, Richards GP (2013): An introduction to food- and waterborne viral disease. U *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control*. Woodhead Publishing Limited, Philadelphia, USA.
12. CORDIS, Community Research and Development Information Service (2013): Final Report Summary - VITAL. Dostupno na: http://cordis.europa.eu/result/rcn/56815_en.html (8.11.2016.)
13. Da Silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS (2007): Evaluation of removal of Noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:7891-7897.
14. DiCaprio E, Yuanmei M, Hughes J, Li J (2013): Epidemiology, prevention, and control of the number one foodborne illness: Human norovirus. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27:561-674.
15. ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control (2013): *Factsheet for health professionals*. Dostupno na:

http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/norovirus_infection/factsheet-health-professionals/Pages/factsheet_health_professionals.aspx (31.11.2016.)

16. EFSA, European Food Safety Authority (2011): Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal*, 9(7):2190.
17. EFSA, European Food Safety Authority (2013): Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (Outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal*, 11(1):3025.
18. EFSA, European Food Safety Authority (2014): Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salads). *EFSA Journal*, 12(3):3600.
19. Ethelberg S, Lisby M, Böttiger B, Schultz AC, Villif A, Jensen T, Olsen KE, Scheutz F, Kjelsø C, Muller L (2010): *Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce*. Euro Surveill, Denmark.
20. European Commission (2015): *RASFF annual report 2014*. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
21. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations Committee on Agriculture (2003): *Development of a framework for Good Agricultural Practices, Seventh session, COAG/2003/6*. Dostupno na: <http://www.fao.org/docrep/meeting/006/y8704e.htm> (2.11.2016.)
22. Franck KT, Lisby M, Fonager J, Schultz AC, Bottiger B, Villif A, Absalonsen H, Ethelberg S (2015): Sources of Calicivirus contamination in foodborne outbreaks in Denmark, 2005-2011 – the role of the asymptomatic food handler. *Journal of Infectious Diseases*, 211:563-570.
23. Gao X, Esseili MK, Lu Z, Saif LJ, Wang Q (2016): Recognition of histo-blood group antigen-like carbohydrates in lettuce by human GII.4 Norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 82:2966-2974.
24. Goodgame RW (2001): Viral causes of diarrhea. *Gastroenterology Clinics of North America*, 30:779-795.
25. Goulter-Thorsen RM, Jaykus LA (2014): Food virology. U *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press, San Diego, SAD.
26. Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK (1994): Norwalk virus infection of volunteers: New insights based on improved assays. *Journal of Infectious Diseases*, 170:34-43.
27. Hall AJ, Patel MM, Lopman BA, Armah GE (2013): Norovirus. U *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. Elsevier Inc.
28. Hutson A, Atmar RL, Estes MK (2004): Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiology*, 12:279-287.

29. ICTVdB (2004): Norovirus. U: *ICTVdB – The universal virus database*. ICTVdB Management, Columbia University, New York.
30. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K (2003): Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:1548-1557.
31. Kalyoussef S, Feja KN (2014): Foodborne illnesses. *Advances in Pediatrics*, 61:287-312.
32. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW (1982): The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *American Journal of Public Health*, 72:1329-1332.
33. Kirkwood CD, Streitberg R (2008): Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *Journal of Clinical Virology*, 43:346-348.
34. Koopmans M, Duizer E (2004): Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90:23-41.
35. Le Guyader FS, Neill FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E, Pommepuy M, Atmar RL (2003): A semi-quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 87:107-112.
36. Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoen-Clouet N, Pommepuy M, Le Pendu J (2006): Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerging Infectious Diseases*, 12:931-936.
37. Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS (2005): Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 123:1-7.
38. Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS, Rocks JJ, Kiel J, Montes JS, Moe CL, Eisenberg JNS, Leon JS (2012): The epidemiology of published norovirus outbreaks: a systematic review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiology and Infection*, 140:1161-1172.
39. Maunula L, von Bonsdorff CH (2016): Norovirus. U *Foodborne Viruses in Ready-to-eat Foods*. Elsevier Inc.
40. Prato R, Lopalco PL, Chirona M, Barbuti G, Germinario C, Quarto M (2004): Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infectious Diseases*, 4:1471-2334.
41. Schmid D, Stüger HP, Lederer I, Pichler AM, Kainz-Arnfelder G, Schreier E, Allerberger F (2007): A foodborne norovirus outbreak due to manually prepared salad, Austria 2006. *Infection*, 35:232-239.
42. Shieh C, Monroe SS, Fankhauser RL, Langlois GW, Burkhardt W, Baric RS (2000): Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *Journal of Infectious Diseases*, 181:360-366.

43. Svraka S, Duizer E, Vennema H, De Bruin E, Van Der Veer B, Dorresteyn B, Koopmans M (2007): Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 45:1389-1394.
44. Škoko I, Listeš E, Listeš I, Kozačinski L (2010): Norovirusi u školjkašima kao akutni problem današnjice. *Meso*, 12(3):173-179.
45. Tam CC, Rodrigues LC, Viviani L, Dodds JP, et al. IID2 Study Executive Committee (2012): Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*, 61(1):69-77.
46. Thorne LG, Goodfellow IG (2014): Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, 95:278-291.
47. Tian P, Bates AH, Jensen HM, Manfrell RE (2006): Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Letters in Applied Microbiology*, 43(6):645-651.
48. Todd EC, Greig JD, Bartleson CA and Michaels BS (2007): Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 2: Description of outbreaks by size, severity, and settings. *Journal of Food Protection*, 70:1975-1993.
49. Tuan Zainazor C, Hidayah MS, Chai LC, Tunung R, Ghazali FM, Son R (2010): The scenario of norovirus contamination in food and food handlers. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:229-237.
50. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass R, Monroe SS (2006): Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346:312-323.