



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU**



Gospava Lazić

**PRISUSTVO I RAŠIRENOST VIRUSA ŽIVOTINJA I LJUDI
U POVRŠINSKIM VODAMA VOJVODINE**

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Novi Sad, 2016.



SADRŽAJ

<i>Lista fotografija</i>	i
<i>Lista tabela</i>	iii
<i>Lista skraćenica</i>	iv
1 UVOD	10
2 PREGLED LITERATURE	13
2.1 KVALITET I ULOGA VODE U PRIRODI	14
2.2 KONTAMINACIJA POVRŠINSKIH VODA	15
2.3 PRENOŠENJE VIRUSA VODOM	16
2.4 KARAKTERISTIKE NAJČEŠĆIH VIRUSNIH KONTAMINENATA POVRŠINSKIH VODA	18
2.4.1 <i>Adenoviridae</i>	18
2.4.2 <i>Caliciviridae</i>	24
2.4.3 <i>Polyomaviridae</i>	26
2.4.4 <i>Hepeviridae</i>	28
2.4.5 <i>Picornaviridae</i>	31
2.5 PRISUSTVO I RAŠIRENOST VIRUSA U VODI	34
2.5.1 Virusi ljudi	37
2.5.1.1 Humani adenovirusi.....	37
2.5.1.2 Norovirusi	39
2.5.1.3 Hepatitis A virus.....	41
2.5.2 Virusi životinja	44
2.5.2.1 Adenovirusi svinja.....	44
2.5.2.2 Poliomavirus goveda	45
2.5.3 Zoonotski virusi.....	47
2.5.3.1 Hepatitis E virus	47
2.6 UTVRĐIVANJE PRISUSTVA VIRUSA U VODI	50
2.7 UKLANJANJE VIRUSA ŽIVOTINJA I LJUDI IZ VODE	57
2.8 DIREKTIVE I ZAKONI U SRBIJI	59
2.8.1 Okvirna direktiva o vodama	60
2.8.2 Zakon o zaštiti životne sredine	60
2.8.3 Zakon o vodama	62
3 CILJ ISTRAŽIVANJA	63
4 MATERIJAL I METODE	65
4.1 Uzorci površinskih voda	66
4.1.1 Uzorci vode reke Dunav.....	68
4.1.2 Uzorci vode reke Krivaja	73
4.1.3 Uzorci vode kanala Dunav-Tisa-Dunav	77
4.1.4 Uzorci vode Paličkog jezera	81
4.1.5 Uzorci vode reke Tisa.....	82
4.1.6 Uzorci vode reke Jegrička	83
4.1.7 Uzorci vode reke Begej.....	84
4.1.8 Uzorci vode Specijalnog rezervata prirode Obedska bara	85
4.1.9 Uzorci vode reke Sava	86



4.1.10	Uzorci vode Rakovačkog potoka.....	88
4.1.11	Uzorci vode Velikog bačkog kanala	88
4.1.12	Uzorci vode KCIII kanala	89
4.1.13	Uzorci vode iz uređaja za prečišćavanje otpadnih voda (UPOV) Sombor	90
4.1.14	Kanalizaciona voda u mestu Odžaci	92
4.1.15	Uzorci vode iz uređaja za prečišćavanje otpadnih voda (UPOV) Subotica	93
4.2	Metode.....	96
4.2.1	Priprema uzoraka i koncentrovanje virusa iz uzoraka vode.....	96
4.2.2	Ekstrakcija nukleinskih kiselina.....	98
4.2.3	Real-time PCR (qPCR) i real-time RT-PCR (RT-qPCR)	99
4.2.4	Lančana reakcija polimeraze (PCR), RT-PCR i nested PCR	102
4.2.5	Sekvenciranje.....	106
4.2.6	Statistička obrada podataka	107
5	REZULTATI.....	108
5.1	Rezultati utvrđivanja prisustva virusa real-time PCR i real-time RT-PCR metodama	109
5.1.1	Prisustvo humanih adenovirusa	111
5.1.2	Prisustvo norovirusa genogrupe II.....	113
5.1.3	Prisustvo norovirusa genogrupe I.....	116
5.1.4	Prisustvo adenovirusa svinja	118
5.1.5	Prisustvo poliomavirusa goveda.....	120
5.1.6	Prisustvo hepatitis E virusa.....	123
5.1.7	Prisustvo hepatitis A virusa	125
5.1.8	Prevalenca virusa po ispitanim lokalitetima.....	126
5.1.9	Prevalenca virusa po ispitanim površinskim vodama.....	128
5.2	Rezultati utvrđivanja prisustva virusa RT-PCR metodom.....	130
5.2.1	Rezultati RT-PCR testa na prisustvo NoV.....	130
5.3	Rezultati utvrđivanja prisustva virusa PCR metodom.....	131
5.3.1	Rezultati PCR testa na prisustvo HAdV.....	131
5.3.2	Rezultati PCR testa na prisustvo BPyV.....	132
5.3.3	Rezultati PCR testa na prisustvo PAdV	132
5.4	Rezultati utvrđivanja prisustva virusa nested PCR metodom.....	133
5.4.1	Rezultati nested PCR testa na prisustvo BPyV.....	133
5.4.2	Rezultati nested PCR testa na prisustvo PAdV	134
5.4.3	Rezultati nested PCR testa na prisustvo HEV	135
5.5	Rezultati sekvenciranja.....	136
5.5.1	Rezultati sekvenciranja dela gena za protein kapsida HAdV.....	136
5.5.2	Rezultati sekvenciranja dela gena RdRp/capsid NoV	138
5.5.3	Rezultati sekvenciranja dela gena za protein kapsida PAdV	139
5.5.4	Rezultati sekvenciranja dela gena za protein kapsida BPyV.....	141
5.5.5	Rezultati sekvenciranja delova ORF1 i ORF2 HEV.....	142
5.6	Kvantifikacija virusa u uzorku	145
6	DISKUSIJA.....	148
6.1	Prisustvo i raširenost HAdV u površinskim i kanalizacionim vodama	149
6.1.1	Prevalenca HAdV u površinskim vodama	149
6.1.2	Prevalenca HAdV u kanalizacionim vodama.....	154
6.1.3	Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih HAdV	156
6.2	Prisustvo i raširenost NoV u površinskim i kanalizacionim vodama	157
6.2.1	Prevalenca NoV u površinskim vodama	157
6.2.2	Prevalenca NoV u kanalizacionim vodama.....	160
6.2.3	Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih NoV	161



6.3	Prisustvo i raširenost PAdV u površinskim i kanalizacionim vodama.....	162
6.3.1	Prevalenca PAdV u površinskim vodama	162
6.3.2	Prevalenca PAdV u kanalizacionim vodama	164
6.3.3	Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih PAdV.....	165
6.4	Prisustvo i raširenost BPyV u površinskim i kanalizacionim vodama	166
6.4.1	Prevalenca BPyV u površinskim vodama	166
6.4.2	Prevalenca BPyV u kanalizacionim vodama	168
6.4.3	Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih BPyV	169
6.5	Prisustvo i raširenost HEV u površinskim i kanalizacionim vodama.....	170
6.5.1	Prevalenca HEV u površinskim vodama	170
6.5.2	Prevalenca HEV u kanalizacionim vodama	172
6.5.3	Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih HEV.....	174
6.6	Prisustvo i raširenost HAV u površinskim i kanalizacionim vodama	175
6.6.1	Prevalenca HAV u površinskim vodama	175
6.6.2	Prevalenca HAV u kanalizacionim vodama.....	176
6.7	Istovremeno prisustvo više virusa u površinskim i kanalizacionim vodama.....	178
6.8	Kvantifikacija virusa u uzorcima površinskih i kanalizacionih voda	179
7	ZAKLJUČAK.....	180
8	LITERATURA	184
9	PRILOG.....	206



Lista fotografija

<i>Slika 1. Putevi prenošenja HAV, NoV i sapovirusa (SAV).....</i>	<i>17</i>
<i>Slika 2. Filogenetsko stablo HAdV.....</i>	<i>20</i>
<i>Slika 3. Struktura čestice adenovirusa.....</i>	<i>21</i>
<i>Slika 4. Filogenetsko stablo klasifikacije norovirusa po genogrupama.....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 5. Organizacija genoma humanog norovirusa.....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 6. Šematski prikaz čestice poliomavirusa.....</i>	<i>27</i>
<i>Slika 7. Filogenetsko stablo hepatitis E virusa.....</i>	<i>28</i>
<i>Slika 8. Filogenetsko stablo izolata hepatitis E virusa genotip 4 u Istočnoj Kini.....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 9. Struktura genoma Hepatitis E virusa.....</i>	<i>30</i>
<i>Slika 10. Filogenetska stabla porodice Picornaviridae.....</i>	<i>32</i>
<i>Slika 11. Šematski prikaz genoma pikornavirusa.....</i>	<i>33</i>
<i>Slika 12. Lokaliteti uzorkovanja na području Autonomne Pokrajine Vojvodine u Srbiji.....</i>	<i>66</i>
<i>Slika 13. Kontejneri za uzorke vode.....</i>	<i>68</i>
<i>Slika 14. Lokalitet uzorkovanja br.1. Dunav - GC-1 Novi Sad.....</i>	<i>70</i>
<i>Slika 15. Lokalitet uzorkovanja br.2. Dunav - GC-2 Novi Sad.....</i>	<i>70</i>
<i>Slika 16. Lokalitet uzorkovanja br.3. Dunav, plaža Oficirac Novi Sad.....</i>	<i>71</i>
<i>Slika 17. Lokaliteti uzorkovanja br.4. i 5. Dunav, plaža Štrand 1. i 2. Novi Sad.....</i>	<i>71</i>
<i>Slika 18. Lokalitet uzorkovanja br.6. Dunav - Plavna.....</i>	<i>72</i>
<i>Slika 19. Lokalitet uzorkovanja br.7. Dunav - Karađorđevo.....</i>	<i>72</i>
<i>Slika 20. Lokalitet uzorkovanja br.8. Dunav - Pančevo.....</i>	<i>73</i>
<i>Slika 21. Lokalitet uzorkovanja br.9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda.....</i>	<i>74</i>
<i>Slika 22. Lokalitet uzorkovanja br.10 Krivaja - Srbobran - između dve farme.....</i>	<i>75</i>
<i>Slika 23. Lokalitet uzorkovanja br.11. Krivaja - farma svinja 1.....</i>	<i>75</i>
<i>Slika 24. Lokalitet uzorkovanja br.12. Krivaja - farma svinja 2.....</i>	<i>76</i>
<i>Slika 25. Lokalitet uzorkovanja br.13. Krivaja - farma 3.....</i>	<i>77</i>
<i>Slika 26. Lokalitet uzorkovanja br.14 Mostonga, DTD kanal.....</i>	<i>78</i>
<i>Slika 27. Lokalitet uzorkovanja br.15. DTD kanal - Sombor.....</i>	<i>78</i>
<i>Slika 28. Lokalitet uzorkovanja br.16. DTD kanal - Odžaci.....</i>	<i>79</i>
<i>Slika 29. Lokalitet uzorkovanja br.17. DTD kanal - Bački Petrovac.....</i>	<i>79</i>
<i>Slika 30. Lokalitet uzorkovanja br.18. DTD kanal - Melenci-Bašaid.....</i>	<i>80</i>
<i>Slika 31. Lokalitet uzorkovanja br.19. DTD - Kikinda.....</i>	<i>80</i>
<i>Slika 32. Lokalitet uzorkovanja br.20. Paličko jezero - posle tretmana prečišćavanja.....</i>	<i>81</i>
<i>Slika 33. Lokalitet uzorkovanja br.21. Paličko jezero - plaža.....</i>	<i>82</i>
<i>Slika 34. Lokalitet uzorkovanja br.22. Tisa - plaža u mestu Čurug.....</i>	<i>83</i>
<i>Slika 35. Lokalitet uzorkovanja br.23. Jegrička u mestu Žabalj.....</i>	<i>84</i>
<i>Slika 36. Lokalitet uzorkovanja br.24. Begej - Zrenjanin.....</i>	<i>85</i>
<i>Slika 37. Lokalitet uzorkovanja br.25. Obedska Bara - Obrež.....</i>	<i>86</i>



Slika 38. Lokalitet uzorkovanja br.26. Sava - Sr. Mitrovica - plaža	87
Slika 39. Lokalitet uzorkovanja br.27. Sava - Sr. Mitrovica.....	87
Slika 40. Lokalitet uzorkovanja br.28. Rakovački potok - Rakovac.....	88
Slika 41. Lokalitet uzorkovanja br.29. Veliki bački kanal - Vrbas.....	89
Slika 42. Lokalitet uzorkovanja br.30. KCIII kanal - Vrbas.....	90
Slika 43. Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda - Sombor.....	91
Slika 44. Lokalitet uzorkovanja br.31. UPOV Sombor	92
Slika 45. Lokalitet uzorkovanja br.32 Kanalizaciona voda - Odžaci.....	93
Slika 46. Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda - Subotica	94
Slika 47. Lokalitet uzorkovanja br.33. UPOV Subotica.....	95
Slika 48. Koncentrovanje virusa iz uzorka vode	97
Slika 49. Kit NucliSENS MiniMag i uzorci za ekstrakciju nukleinskih kiselina.....	98
Slika 50. Real-time PCR System	100
Slika 51. Elektroforeza.....	105
Slika 52. GelDoc-It ² Imager	106
Slika 53. Detekcija HAdV u uzorcima vode metodom real-time PCR.....	113
Slika 54. Detekcija NoV GII u uzorcima vode metodom real-time RT-PCR	115
Slika 55. Detekcija NoV GI u uzorcima vode metodom real-time RT-PCR	118
Slika 56. Detekcija PAdV u uzorcima vode metodom real-time PCR	120
Slika 57. Detekcija BPyV u uzorcima vode metodom real-time PCR.....	122
Slika 58. Detekcija HEV u uzorcima vode metodom Real-time RT-PCR	124
Slika 59. Detekcija HAV u uzorcima vode metodom real-time RT-PCR.....	125
Slika 60. Detekcija RT-PCR produkata NoV na agaroznom gelu.....	130
Slika 61. Detekcija PCR produkata HAdV na agaroznom gelu	131
Slika 62. Detekcija PCR produkata BPyV na agaroznom gelu.....	132
Slika 63. Detekcija PCR produkata PAdV na agaroznom gelu	133
Slika 64. Detekcija nested PCR produkata BPyV na agaroznom gelu	134
Slika 65. Detekcija nested PCR produkata PAdV na agaroznom gelu.....	134
Slika 66. Detekcija nested PCR produkata HEV na agaroznom gelu.....	135
Slika 67. Molekularna filogenetska analiza HAdV	137
Slika 68. Molekularna filogenetska analiza NoV	139
Slika 69. Molekularna filogenetska analiza PAdV.....	140
Slika 70. Molekularna filogenetska analiza BPyV	142
Slika 71. Molekularna filogenetska analiza HEV ORF1	143
Slika 72. Molekularna filogenetska analiza HEV ORF2	145
Slika 73. Detekcija MNoV u uzorcima vode metodom Real-time RT-PCR.....	146
Slika 74. Detekcija MNoV u uzorcima vode metodom Real-time RT-PCR.....	146



Lista tabela

<i>Tabela 1. Klasifikacija HAdV prema grupama, serotipovima i mestima infekcije</i>	19
<i>Tabela 2. Lokaliteti i vreme uzorkovanja</i>	67
<i>Tabela 3. Prajmeri i probe za real-time (RT)-PCR.....</i>	99
<i>Tabela 4. Prajmeri za PCR, RT-PCR i nested PCR.....</i>	102
<i>Tabela 5. Podaci o uzorcima i rezultati prisustva odabranih virusa detektovanih real-time (RT) PCR metodom.....</i>	109
<i>Tabela 6. Rezultati utvrđivanja prisustva HAdV metodom real-time PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja</i>	111
<i>Tabela 7. Rezultati utvrđivanja prisustva NoV GII metodom real-time RT-PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja</i>	114
<i>Tabela 8. Rezultati utvrđivanja prisustva NoV GI metodom real-time RT-PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja</i>	117
<i>Tabela 9. Rezultati utvrđivanja prisustva PAdV metodom real-time PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja</i>	119
<i>Tabela 10. Rezultati utvrđivanja prisustva BPvY metodom real-time PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja</i>	121
<i>Tabela 11. Rezultati utvrđivanja prisustva HEV metodom real-time RT-PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja</i>	123
<i>Tabela 12. Prevalenca virusa po ispitanim lokalitetima uzorkovanja</i>	127
<i>Tabela 13. Prevalenca virusa po ispitanim površinskim vodama</i>	129
<i>Tabela 14. Najverovatniji broj PDU utvrđenih virusa u 1L ispitanog uzorka površinske vode .</i>	147
<i>Tabela 15. Sekvence deponovane u GenBank</i>	207



Lista skraćenica

AiV - Aichi virus
AqV - Aquamavirus
AvEMV - Avian encephalomyelitis virus
AvSV - Avian sapelovirus
BadV - Bovine adenovirus
BEV - Bovine enterovirus
BkoV - Bovine kobuvirus
bp - bazni parovi
BPyV - *Bos taurus polyomavirus 1*, Bovine polyomavirus - poliomavirus goveda
BRBV - Bovine rhinitis virus
CI - interval poverenja (eng. *Confidence interval*)
CosaV - Human cosavirus
CPE - citopatogeni efekat
CRE - Cis reaktivni elemenat
DAdV - Duck adenovirus
DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP - dezoksinukleotidi
DTD - Dunav-Tisa-Dunav kanal
DuHV - Duck hepatitis A virus
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV - Encephalomyocarditis virus
EPA - Agencija za zaštitu životne sredine u SAD-u (Environmental Protection Agency)
ERAV - Equine rhinitis virus
EV -Enterovirus
FMDV - Foot-and-mouth disease virus
GC/L - genomskih kopija virusa po 1L vode
GK - gradska kanalizacija
HAdV - Human adenovirus - adenovirus ljudi
HAV - Hepatitis A virus
HCl - Hlorovodonična kiselina
HEV -Hepatitis E virus
HpeV - Human parechovirus
HRV - Human rhinovirus
ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses
IFA - imunofluorescencija
IgG - Imunoglobulin G
JR - Junction region



kb - kilobaza
LJV - Ljungan virus
Mg - Magnezijum
MNoV - Murine norovirus
NaOH - Natrijum hidroksid
NASBA - Nucleic Acid Sequence Based Amplification - Amplifikacija sekvenci nukleinskih kiselina
nm - nanometara
NoV - Norovirus
NoV GI - Norovirus genogrupa I
NoV GII - Norovirus genogrupa II
NTC - No template control - negativna kontrola
OAdV - Ovine adenovirus
ORF - Open reading frame
PAdV - Porcine adenovirus - adenovirus svinja
PBS - Phosphate Buffered saline
PCR - Lančana reakcija polimeraze - „Polymerase chain reaction“
PDU - PCR Detectable units (PCR detektabilna jedinica virusa)
PEV - Porcine enterovirus
PPOV - Postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda
PSV - Porcine sapelovirus
PTeV - Porcine teschovirus
qPCR - real-time PCR (real-time quantitative PCR)
RT-qPCR (real-time quantitative reverse transcription PCR)
RdRp - RNA-dependent RNA polymerase gene
RNK - Ribonukleinska kiselina
RT - Reverzna transkripcija
RT-PCR - Reverzna transkripcija lančane reakcije polimeraze
SAD - Sjedinjene Američke države
SaliV - Salivirus
SaV - Sapovirus
SiEV - Simian enterovirus
SiSV - Simian sapelovirus (SiSV)
SVV - Seneca Valley virus
TAE - Tris-acetate-EDTA buffer
TMEV - Theilovirus
TP - Tretman prečišćavanja
UPOV - Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda
UV - Ultravioletno



1 UVOD



Uloga vode u prirodi je više nego značajna - voda je neophodna za održavanje života svih živih bića. Kvalitet vode, bez obzira da li se ona koristi za piće ili za navodnjavanje, industrijsku preradu hrane ili pak u rekreativne svrhe, ima veoma važan uticaj na zdravlje. Virusi imaju poseban značaj za zdravlje ljudi i životinja zbog njihove široke distribucije, brzog prenošenja i velikog ekonomskog uticaja (Barardi i sar, 2012). Prisustvo patogenih virusa ljudi i životinja u vodi reflektuje fekalnu kontaminaciju i ukazuje na opasnost za zdravlje ljudi i životinja, što predstavlja osnovni razlog za neophodnost praćenja virusološke ispravnosti površinskih voda. Ljudi i životinje izlučuju više od 100 vrsta patogenih virusa u spoljašnju sredinu (Melnick, 1984). Pored toga što izazivaju akutne bolesti virusi su veoma bitni za javno zdravlje zbog niske infektivne doze (Fong i Lipp, 2005). Iako nekoliko virusa mogu izazvati akutni gastroenteritis, humani norovirus (NoV) se pokazao kao uzročnik većine epidemija ne-bakterijskog gastroenteritisa širom sveta. Direktni izvor humanog norovirusa su fekalije ljudskog porekla (EFSA, 2011). I nekoliko drugih RNK virusa poput rotavirusa, sapovirusa, astrovirusa i enterovirusa mogu izazvati epidemije gastroenteritisa (Bosch i sar, 2008; Petrovic, 2013). Adenovirusi mogu izazvati mnoštvo respiratornih infekcija, infekcije oka, infekcije urogenitalog trakta, gastroenteritis i encefalitis (Sinclair i sar, 2009). Humani adenovirusi (HAdV) su predloženi za indikatore humanog fekalnog zagađenja u životnoj sredini (Girones, 2006; Wyn-Jones i sar, 2011). Infekcija adenovirusima svinja (PAdV) obično je asimptomatska, nekada se primete slučajevi blage dijareje ili blagih respiratornih znakova infekcije (Fong i Lipp, 2005). Poliomavirusi goveda (BPyV) su relativno otporni na faktore životne sredine i procese inaktivacije i predloženi su za indikatore animalnog fekalnog zagađenja u životnoj sredini (Hundesda i sar, 2006; Girones i sar, 2010; Girones i Bofill-Mas, 2013). Hepatitis E virus (HEV), kao zoonotski virus, kod ljudi se manifestuje kao akutni ikterični hepatitis i predstavlja ozbiljan zdravstveni problem u zemljama u razvoju. Epidemije i sporadične infekcije u ovim zemljama su rezultat fekalne kontaminacije vode za piće (Erker i sar, 1999). Hepatitis E virus je značajno rasprostranjen u populaciji svinja u Srbiji (Lupulovic i sar, 2010) a samim tim može biti prisutan i u površinskim vodama. Infekcija hepatitis A virusom (HAV) je vodeći uzrok akutnog virusnog hepatitisa širom sveta (Hundesda i sar, 2010).

Prisustvo animalnih, humanih a posebno zoonotskih virusa je proučavano i praćeno u mnogim zemljama širom sveta (Erker i sar, 1999; Girones, 2006; Kokkinos i sar, 2012). Na području Srbije se ne prati prisustvo patogenih virusa ljudi i životinja ni u površinskim



vodama, a pa čak ni u vodama za piće, niti je uspostavljena metodologija ovih ispitivanja u nadležnim institucijama u Srbiji. Osim toga, tretman otpadnih voda i kanalizacije se retko sprovodi, ili je u delimičnoj funkciji, naročito u malim gradovima i selima, kao i u nekim velikim gradovima u Srbiji. Ovakvo stanje ukazuje na neophodnost uspostavljanja i uvođenja metodologije analize prisustva patogenih virusa u vodama, kao i ispitivanja njihovog prisustva u površinskim vodama u Srbiji. Shodno tome, po prvi put u Srbiji sproveden je nadzor u cilju procene prisustva i učestalosti pojave virusa kod ljudi ((HAdV, norovirusi genogrupe I i II (NoV GI i NoV GII) i HAV)), životinja (PAdV i BPyV) i zoonotskih (HEV) virusa u površinskim vodama na teritoriji Vojvodine. Adenovirusi su izabrani kao fekalni pokazatelji na osnovu njihove stabilnosti u okruženju, a NoV i HAV su izabrani kao najčešći izazivači gastroenteritisa širom sveta. Virus životinja i zoonotski virusi PAdV, BPyV i HEV su izabrani kako bi se procenilo da li postoji fekalna kontaminacija poreklom od životinja, i da li ispitivane površinske vode predstavljaju moguće rezervoare infekcije, tj. opasnost za javno zdravlje.



2 PREGLED LITERATURE



2.1 KVALITET I ULOGA VODE U PRIRODI

Globalizacija, nove tehnologije i evolucija patogena, ljudi i vektora uticali su na pojavu novih pretnji na kvalitet vode. Uprkos ulaganjima u tehnologije za poboljšanje kvaliteta vode, bolesti koje se prenose vodom i dalje imaju velike posledice na javno zdravlje, kako u industrijski nerazvijenim tako i u razvijenim zemljama (La Rosa i sar, 2012). Kvalitet vode, bez obzira da li se ona koristi za piće ili za navodnjavanje, industrijsku preradu hrane ili pak u rekreativne svrhe, ima veoma važan uticaj na zdravlje. Voda za piće, površinske vode kao i vode za rekreaciju u Srbiji se kontrolišu sa mikrobiološkog aspekta pretežno primenom bakterioloških pokazatelja, odnosno utvrđuje se bakteriološki kvalitet vode. Do sada nisu pronađeni elektronski dostupni podaci o utvrđivanju prisustva virusa u površinskim i drugim vodama u Srbiji. S tim u vezi, stanje opterećenosti površinskih voda patogenim virusima ljudi i životinja u Srbiji je potpuno nepoznato, a samim tim je nepoznat i rizik za zdravlje ljudi i životinja od mogućih infekcija i epidemija. Prisustvo patogenih virusa ljudi i životinja u vodi reflektuje fekalnu kontaminaciju i ukazuje na opasnost za zdravlje ljudi i životinja, što predstavlja osnovni razlog za neophodnost praćenja virusološke ispravnosti površinskih voda.

Mikrobiološki patogeni koji se prenose vodom mogu da izazovu bolest u zavisnosti od doze i fizičkog stanja izloženog pojedinca. Izloženost ovim patogenima ne mora uvek rezultirati infekcijom, niti infekcija uvek dovodi do bolesti i manifestacije kliničke slike (Pond, 2005).

Tri glavne komponente utiču na verovatnoću infekcije čoveka patogenim mikroorganizmima:

- životna sredina, koja mora biti povoljna za opstanak patogena i interakciju patogena sa domaćinom;
- patogen mora imati specifičan faktor virulencije potreban da izazove infekciju i
- domaćin mora biti podložan infekciji.

Klimatske promene, kao što su povišene temperature i ekstremni hidrološki događaji dodatno povećavaju potencijal za infekcije i bolesti. Poplave uzrokovane obilnim padavinama mogu stvoriti ogromne površine stajaće vode i samim tim i nove oblasti za potencijalnu izloženost patogenima. Razni fizički, hemijski i biološki činioci takođe mogu imati uticaj na opstanak patogenih mikroorganizama, kao što su sunčeva svetlost, temperatura vode, salinitet, pH, dostupnost hranljivih sastojaka, prisustvo otrovnih



materija, prisustvo predatora (protozoe i drugi beskičmenjaci) i kompeticija sa autohtonim mikroorganizama (Robertson i Yasvinski, 2012).

2.2 KONTAMINACIJA POVRŠINSKIH VODA

Površinske vode mogu biti direkto ili indirektno kontaminirane virusima preko (ne)tretirane kanalizacione vode ili fekalnog otpada poreklom od životinja (Lodder i de Roda Husman, 2005). Feces i urin poreklom od ljudi i životinja su verovatno najveći izvor patogenih mikroorganizama za životnu sredinu i u vezi su sa bolestima koje se prenose vodom. Ljudi, životinje i ptice izbacuju milijarde tona fekalija u životnu sredinu svake godine. Veći deo njihovog fecesa dospeva u površinske vode direktno defekacijom ili indirektno nakon tretmana otpadnih voda, spiranjem tokom i nakon padavina. Pored toga što često kontaminiraju vodu koja se koristi za kupanje i rekreaciju, tako i veoma često dolazi do zagađivanja vode koja se koristi za piće i navodnjavanje useva (Bartram i sar, 2012). Ovaj fekalni otpad može sadržati patogene mikroorganizme koji mogu predstavljati rizik za ljude izložene zagađenoj površinskoj vodi. Studije sprovedene kako u slatkovodnim, tako i u morskim vodama pokazale su da nivo fekalne kontaminacije u vodi povećava frekvenciju gastrointestinalnih bolesti kod plivača (Dufour i sar, 2012). Otpadne vode nakon tretmana prečišćavanja se najčešće ispuštaju u recipijente kao što su reke, jezera i mora. Recipijenti mogu da se koriste i u druge svrhe, kao što su izvori pitke vode, voda za navodnjavanje i gajenje ribe za ljudsku ishranu ili pak u rekreativne svrhe (Myrmel i sar, 2015). Mnoge reke koje se nakon tretmana prečišćavanja koriste kao izvori vode za piće, nalaze se nizvodno od tretiranih otpadnih voda i/ili septičkih jama što predstavlja veoma ozbiljan problem za zdravlje ljudi koji se snabdevaju vodom sa ovakvih područja. Fekalna kontaminacija poreklom od životinja može predstavljati rizik za infekciju ljudi virusima, jer su mnogi od njih zoonozni agensi (Haramoto i sar, 2012). Smatra se da više od 1.400 patogenih mikroorganizama (bakterijski, virusni, parazitski i gljivični) mogu biti povezani sa bolestima ljudi. Među ovim patogenima, približno 61,0 % su životinjskog porekla (Bartram i sar, 2012). Prisustvo enteričnih virusa u vodi i drugim uzorcima iz životne sredine ukazuje na fekalnu kontaminaciju (Buitrago i sar, 2010).



Broj virusnih čestica u otpadnoj vodi može da varira u zavisnosti od sezone i samog lokaliteta. Efikasnost tretmana prečišćavanja takodje utiče na brojnost virusa u otpadnoj vodi (Myrmeel i sar, 2015). Fekalni indikatori se koriste dugi niz godina za merenje kvaliteta vode i utvrđivanje bezbednosti vode za kupaće. Smatra se da su najveći uzročnici gastrointestinalnih bolesti, naročito kod plivača, upravo virusi (Dufour i sar, 2012). Kod ljudi sa virusnom infekcijom izlučuje se od 10^5 do 10^{11} virusnih čestica po gramu stolice i zato je koncentracija virusa u fekalnim otpadnim vodama veoma visoka (La Rosa i sar, 2012). Čak i ako je koncentracija virusa veoma niska postoji potencijalna mogućnost od infekcije jer neki virusi imaju veoma niske infektivne doze.

Analize neprečišćenih otpadnih voda predstavljaju efikasan način da se identifikuju enterični virusi koji cirkulišu u populaciji. Kanalizacioni sistemi prikupljaju patogene i otpadne vode se transportuju u postrojenja za tretman. Utvrđeno je da je koncentracija mikroorganizama u otpadnoj vodi povezana sa incidencijom bolesti u populaciji stanovništva (Kaas i sar, 2015).

2.3 PRENOŠENJE VIRUSA VODOM

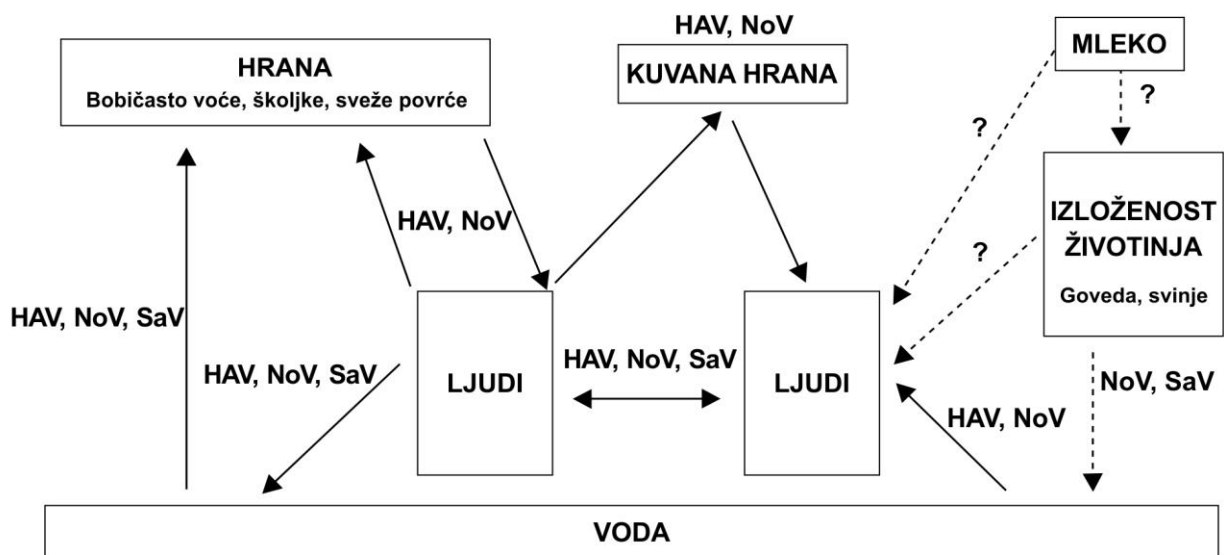
U Evropskoj Uniji 1991. godine je usvojena Direktiva o tretmanu gradskih otpadnih voda 91/271/EEZ, za zaštitu vode i životne sredine od štetnih efekata ispuštanja komunalnih otpadnih voda i pojedinih industrijskih otpadnih voda. Ovo je veoma važan standard ali se vrednosti kvaliteta voda koje se ispuštaju u površinske vode nakon tretmana prečišćavanja procenjuju na osnovu hemijskih i biohemijskih parametara, uključujući i biohemijsku i hemijsku potrošnju kiseonika, ukupne suspendovane materije i ukupan fosfor i azot, a ne podrazumevaju kontrolu patogena, kao što su virusi. U mulju koji preostaje nakon tretmana prečišćavanja virusi takođe mogu biti prisutni, što predstavlja potencijalnu opasnost (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012).

Patogeni virusi se izlučuju od strane ljudi i životinja u okruženje kroz fekalije, urin, pljuvačku, znoj i suze. Samim tim, potencijalni izvori infekcije su voda, kanalizacija, mulj, đubrivo, vazduh, voće i povrće, školjke (Lodder i sar, 2015; Rodriguez-Lazaro i sar, 2012). Kada se nađu u životnoj sredini, patogeni se transportuju do površinskih voda spiranjem, podzemnim vodama i na mnoge druge načine (Corsi i sar, 2015). Enterični virusi, uključujući



NoV, HAV i HEV smatraju se veoma stabilnim. Nakon disperzije virusa u životnu sredinu inaktivacija zavisi od vrste virusa i sredine u kojoj se nalazi (inaktivacija je brža u tečnom nego u čvrstom stajnjaku). Enterični virusi mogu preživeti veoma dugo (čak i godinu dana) na temperaturi ispod 5°C, naročito u odsustvu UV zračenja. Virusi kao što su HAV, HEV i NoV su otporni na inaktivaciju veoma dugo vremena (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012; Lodder i sar, 2015).

Površinske vode se koriste za proizvodnju pijaće vode, u rekreativne svrhe, za uzgoj školjki, ribe i za navodnjavanje useva. Ljudi mogu biti izloženi patogenima preko kontaminirane površinske vode na nekoliko načina: preko (neadekvatno) tretirane vode za piće, putem direktnog uzimanja površinske vode tokom rekreativne aktivnosti, ili potrošnjom kontaminirane hrane ili prehrambenih proizvoda (Lodder i sar, 2015). Brojne epidemije čiji su uzročnici virusi su izazvane fekalno zagađenom vodom za piće i onom koja se koristi za rekreaciju. Mnogi enterični virusi izazivaju bolesti kod ljudi i životinja a potom se fekalnim putem izlučuju u životnu sredinu (Sl.1).



Slika 1. Putevi prenošenja HAV, NoV i sapovirusa (SAV)
(modifikovano od Taylor, 2011)

Mnoge studije su potvrdile veoma visoku koncentraciju adenovirusa u fekalijama inficiranih ljudi (oko 10^6 čestica virusa u gramu fecesa), čak mnogo višu od enterovirusa. U vodi adenovirusi mogu da opstanu duže od enterovirusa i HAV i otporni su na UV zrake. U vodi koja se koristi za rekreaciju ovaj virus je bitan pokazatelj kvaliteta vode (La Rosa i sar, 2012).



Norovirusi su otkriveni u rekama, bazenima, podzemnim vodama i vodi za piće širom sveta. Veoma su otporni na nepovoljne uslove životne sredine. Mogu da prežive hlorisanje u koncentracijama do 10 ppm i temperature ispod 0°C i iznad 60°C (La Rosa i sar, 2012). broj čestica NoV u rečnim vodama zavisi od (ne)tretiranih ispusta kanalizacije i drugih izvora. Sezonske varijacije su ispitivane u mnogim studijama i generalno je primećeno da su norovirusne infekcije češće tokom zime i u rano proleće najverovatnije zbog toga što su niske temperature veoma povoljne za konzervaciju virusa (Mathijs i sar, 2012).

Hepatitis A virus može da preživi i do 60 dana u vodi za piće, preko 6 nedelja u rečnoj vodi, preko 8 nedelja u podzemnoj vodi, pa čak i do 30 nedelja u morskoj vodi. Hepatitis A virusi su otkriveni u netretiranoj i tretiranoj otpadnoj vodi, površinskim i pijaćim vodama. Što se tiče rekreativnih voda, zabeležene su četiri epidemije hepatitis A virusa, vezane za jezera, bazene i termalne vode tj. banje (La Rosa i sar, 2012).

Epidemije izazvane hepatitis E virusom su zabeležene u zemljama sa lošim sanitarnim uslovima i uglavnom su povezane sa vodom za piće i kanalizacionom vodom. Takođe, detektovan je i u rekama. Povećana brojnost ovog virusa u kanalizaciji ukazuje na potencijalnu kontaminaciju površinskih voda, a samim tim na zdravlje ljudi (La Rosa i sar, 2012).

Adenovirusi svinja (PAdV) su visoko prevalentni u populaciji domaćih svinja. Izlučuju se fekalijama i urinom. Ovi virusi su veoma stabilni u vodi i služe kao indikator prisustva fekalne kontaminacije u vodi (Viancelli i sar, 2012).

Reultati mnogih istraživanja su pokazali da je goveđi poliomavirus (BPyV) veoma koristan za praćenje izvora fekalne kontaminacije u vodi (Hundesda i sar, 2006).

2.4 KARAKTERISTIKE NAJČEŠĆIH VIRUSNIH KONTAMINENATA POVRŠINSKIH VODA

2.4.1 *Adenoviridae*

Porodica *Adenoviridae* sastoji se od pet serološki različitih rodova. Rod *Mastadenovirus* čine virusi koji inficiraju samo sisare. Genom i replikacija su najviše proučavani za *Human mastadenovirus C* ali su skoro sva saznanja generalno primenljiva na sve pripadnike roda. Virusi roda *Aviadenovirus* inficiraju samo ptice. Adenovirusi ptica izazivaju različite bolesti

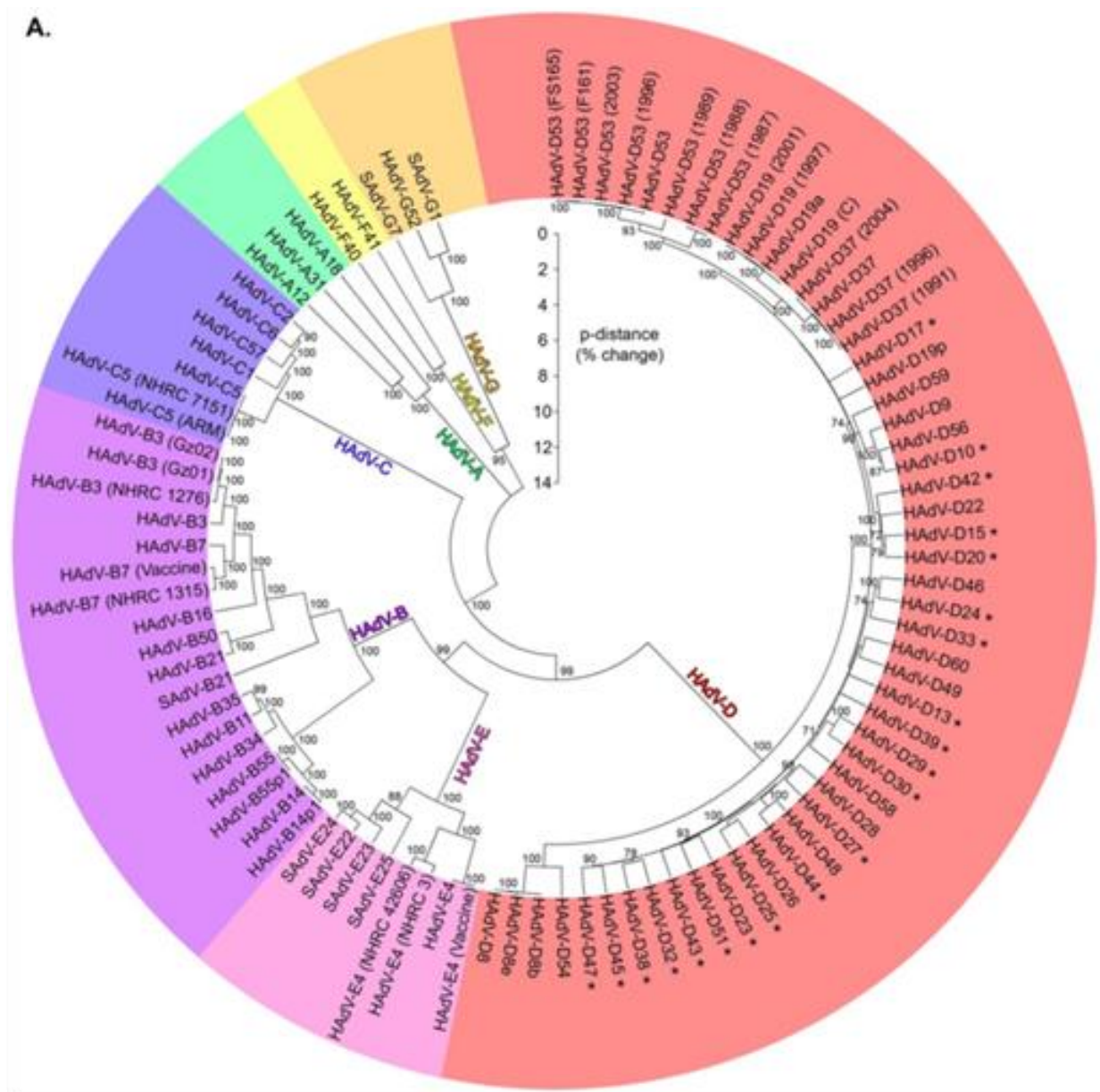


kao što su bronhitis i plućni edem kod različitih vrsta ptica. Rod *Atadenovirus* uključuje viruse koji inficiraju širok spektar domaćina, uključujući zmije, guštere, patke, guske, kokoške i preživare. Virion je relativno stabilan i zadržava infektivnost nakon tretmana zagrevanja na 56°C nakon 30 minuta. Pojedini atadenovirusi mogu da izazovu hemoragijske epidemije kod preživara. *Duck atadenovirus A* („egg drop syndrome virus“) je takođe povezan sa određenim bolestima živine koje se globalno karakterišu naglim smanjenjem proizvodnje jaja. *Ovine atadenovirus D* se koristi za ljudske vakcine i genske terapije. Rod *Siadenovirus* uključuje *Frog siadenovirus A* i *Turkey siadenovirus A*, nekoliko virusa grabljivica i kornjača. Peti rod je *Ichtadenovirus* koga čini samo jedan član, a to je adenovirus bele jesetre. Sevenca je dužine 48,395 bp i stoga je duža od sekvence bilo kog poznatog adenovirusa. Smatra se da ovaj virus nije patogen za ribe (Harrach i sar, 2011; MacLachlan i Dubovi, 2011).

Humani mastadenovirusi (ranije humani adenovirusi - HAdV) pripadaju porodici *Adenoviridae*, rodu *Mastadenovirus* (Albinana-Gimenez i sar, 2006; Yezli i Otter, 2011). U izveštaju Međunarodnog komiteta za taksonomiju virusa odobrena su 54 serotipa klasifikovana u grupe A-G (Tab.1) (Harrach i sar, 2011). Na slici 2. je prikazano filogenetsko stablo humanih adenovirusa.

Tabela 1. Klasifikacija HAdV prema grupama, serotipovima i mestima infekcije

Grupe	Serotipovi	Mesta infekcije
A	12, 18, 31	gastrointestinalni trakt
B	3, 7, 16, 21, 50, 11, 14, 34, 35	pluća, urinarni trakt
C	1,2,5,6	gornji respiratorni trakt
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 20, 25, 28, 29, 53, 54	oči, gastrointestinalni trakt
E	4	respiratorni trakt
F	40, 41	gastrointestinalni trakt
G	52	gastrointestinalni trakt



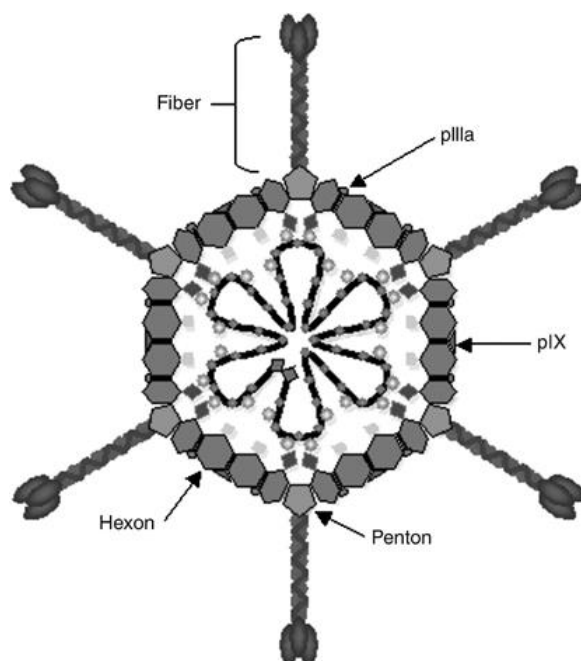
Slika 2. Filogenetsko stablo HAdV
(Robinson i sar, 2013)

Humani adenovirusi su DNK virusi srednje veličine (70-90nm), sa ikozaedarnim kapsidom i vlaknastim nastavcima na svakom vrhu ikozaedra. Kapsid je kubične simetrije i sastoji se od 252 kapsomere, od kojih su 264 heksona a 12 penton (Glasgow i sar, 2006; MacLachlan i Dubovi, 2011). Filamentnozni nastavci služe za pričvršćivanje virusa za ćeliju domaćina i u zavisnosti od serotipa variraju u veličini i broju (Toogood i sar, 1992; Russell, 2009; San Martin, 2012). Pored ova tri glavna proteina (hekson, penton i filament), kapsid ima još 4 dodatna proteina: IIIa, VI, VIII i IX (Saban i sar, 2006). Genom čini linearna dvolančana DNK, molekulske mase od oko 35 kbp koja kod većine serotipova kodira više od 30 stukturnih i



nestrukturnih proteina (Sl.3) (Glasgow i sar, 2006; MacLachlan i Dubovi, 2011). Unutar kapsida nalaze se četiri dodatna proteina (V, VII, mu i terminalni protein) i višestruke kopije proteaze adenovirusa (Saban i sarj, 2006).

Iako svi adenovirusi imaju sličnu morfologiju, organizacija genoma se razlikuje između virusa različitih rodova. Vrste roda *Mastadenovirus* sadrže proteine V i IX. Protein V je uključen u transport virusne DNK u jedro ćelije a protein IX je aktivator transkripcije. Geni koji kodiraju proteine V i IX su odsutni kod adenovirusa ptica, a njihov genom je 20,0-45,0% veći od genoma mastadenovirusa. Strukturna organizacija genoma vrsta roda *Siadenovirus* je jedinstvena po tome što geni koji kodiraju proteine V i IX i regione E1, E3 i E4 su odsutni (MacLachlan i Dubovi, 2011).



Slika 3. Struktura čestice adenovirusa
(Glasgow i sar, 2006)

Adenovirusi su prvi put izolovani od strane Rowe i sar. (1953). Citopatogeni efekat koji su ovi autori uočili od uzoraka adenoidnog tkiva se smatralo da je nastao od nepoznatog mikroorganizma koji su nazvali "uzročnik degeneracije adenoida". Nekoliko godina kasnije čitava porodica virusa je dobila naziv prema tkivu iz kojeg je izolovan (Tabain, 2011).

Put prenošenja HAdV je fekalno-oralni i aerosolom (Fong i Lipp, 2005). Humani adenovirusi su uspešno detektovani u različitim uzorcima životne sredine, kao što su reke, jezera, voda iz kanalizacionih sistema, tretirana otpadna voda i bazeni (van Heerden i sar, 2005; Silva i



sar, 2010, 2011; Rodriguez-Lazaro i sar, 2012). Humani adenovirusi predstavljaju ozbiljan problem za javno zdravlje jer pripadaju najotpornijim i najprisutnijim virusima u vodi. Razlog za to je što su otporni su na mnoge dezinfekcione tretmane, kao što su UV zračenje i hlor (Pond, 2005; Silva i sar, 2010; Carratala i sar, 2013). Otpornost na UV zračenje je naročito karakteristična za serotipove 40 i 41 (Jiang, 2006). Od strane Agencije za zaštitu životne sredine SAD, stavljeni su na listu kandidata koji kontaminiraju vodu za piće. Studije širom evrope su dokazale da oko 20,0 % uzoraka rečne i oko 47,0 % morske vode sadrže adenovirus (Jothikumar i sar, 2005; Wyn-Jones i sar, 2011; Ziros i sar, 2015). Humani adenovirusi izazvaju najčešće respiratorne infekcije, gastrointestinalne, urinarne i infekcije oka, a mogu dovesti do teških bolesti mozga, srca, bubrega i jetre (Yezli i Otter, 2011). Simptomi se mnogo češće javljaju kod dece i imunokompromitovanih osoba. Ovaj virus je pored rotavirusa primarni uzrok gastroenteritisa kod dece (Jiang i sar, 2006).

Za neke serotipove adenovirusa simptomi variraju u zavisnosti od mesta infekcije. Infekcija izazvana inhalacijom adenovirusa tip 7 povezana je sa težom kliničkom slikom bolesti respiratornog trakta, dok oralno prenošenje ovog virusa obično prolazi bez simptoma ili sa blagom kliničkom slikom bolesti. U Australiji u jednoj bolnici je analizirano oko 5000 uzoraka stolice tokom perioda 1981-1996. godine. Rezultati su pokazali da je bilo 3,0 % do 9,0 % slučajeva gastroenteritisa izazvanih HAdV, najčešće kod dece. Dominantan je bio serotip 41 (40,0 % do 80,0 %) dok je serotip 40 bio zastupljen u manjem procentu (manje od 20%). Uočen je i sezonski karakter HAdV. Tip 41 je preovladavao u periodu kasne jeseni, dok je tip 40 bio zastupljen tokom cele godine (Grimwood i sar, 1995; Pond, 2005).

Humani adenovirusi su prisutni u kanalizacionoj vodi u većoj brojnosti od ostalih enteričnih virusa i mogu se izlučivati fecesom mesecima nakon infekcije (Bofill-Mas i sar, 2010; Fong i sar, 2010). Bazirajući se na njihovim epidemiološkim karakteristikama, HAdV su predloženi za indikatore humanog fekalnog zagađenja, iako su i drugi enterični virusi prisutni tokom dužeg vremenskog perioda u površinskim vodama (Pina i sar, 1998; Bofill-Mas i sar, 2000; Albinana-Gimenez i sar, 2006; Chigor i Okoh, 2012a; Carratala i sar, 2013). Procenjuje se da je više od 90,0 % humane populacije seropozitivno na jedan ili više serotipova adenovirusa (Fong i sar, 2010). Humani adenovirusi i humani poliomavirusi (HPyV) mogu se naći u svim geografskim područjima i tokom cele godine, kao i enterovirusi (EV), NoV, rotavirusi (RV), astrovirusi (ASTV), HAV i HEV, koji su otkriveni sa promenljivom prevalencom u različitim



geografskim područjima, periodima u godini, a mogu da dovedu do epidemije (Girones i Bofill-Mas, 2013).

Adenovirusi svinja (Porcine adenovirus - PAdV) pripadaju rodu *Mastadenovirus* i porodici *Adenoviridae*. Prvi adenovirus svinja je izolovan 1964. godine (Hammond i Johnson, 2005). Trenutno, postoji pet serotipova PAdV: serotip 1-3 (PAdV 1-3) pripada vrsti PAdV A, serotip 4 (PAdV-4) pripada vrsti PAdV B i serotip 5 (PAdV-5) pripada vrsti PAsVC. Serotip 4 (soj NADC-1) se najčešće izoluje. Referentni soj je izolovan iz mozga svinja koje su imale encefalitis (Guardado-Calvo i sar, 2010; SHC i CFSPH, 2015). Serotipovi 1, 2 i 3 ređe izazivaju viremiju, međutim, postoje dokazi o prijavljenim sistemskim infekcijama za serotipove 1 i 3 (Nietfeld i Leslie-Steen, 1993; Guardado-Calvo i sar, 2010). Adenovirus svinja tip 5 je izolovan u Japanu (Tuboly i Nagy, 2001). Reddy i sar. (1995) su utvrdili genetsku vezu između PAdV tip 1 (soj 25R), PAdV tip 2 (soj A47) sa PAdV tip 3. Adenovirus svinja tip 3 je prvi put izolovan iz rektalnih briseva kod zdravih svinja 1967. godine, a kompletan genom je objavljen 1998. godine (Reddy i sar, 1999a, 1999b). Rezultati eksperimenata Reddy i sar. (1996) su pokazali da je E-3 region gena kod PAdV tipova 1, 2 i 3 kraći i jednostavniji nego E-3 region kod humanih adenovirusa (Reddy i sar, 1996).

Infekcija adenovirusima svinja je endemska širom sveta i obično ne dovodi do teške kliničke slike i veoma često je asimptomatska, ali su zabeleženi i slučajevi blage dijareje i blaži respiratorni znaci infekcije. Takođe, PAdV mogu da se izoluju kod svinja kod kojih postoji encefalitis ili pneumoenteritis (Fong i Lipp, 2005; SHC i CFSPH, 2015). Adenovirusi svinja su veoma rasprostranjeni u populaciji svinja (Maluquer de Motes i sar, 2004; Hundesa i sar, 2006; Viancelli i sar, 2012). Adenovirusi svinja se često mogu naći u uzorcima fekalija svinja i u uzorcima iz životne sredine (Buitrago i sar, 2010). Do sada, svinje su jedini poznati domaćin ovog virusa. Nije bilo objavljenih podataka o zoonotskom prenosu infekcije sa svinja na ljude (SHC i CFSPH, 2015).

Fekalno-oralni i fekalno-nazalni put smatraju se primarnim oblicima prenošenja adenovirusa svinja. Adenovirusi svinja su prisutni u tubularnom epitelu bubrega, a potvrđeno je da opstaju u bubrezima i da mogu da se izoluju iz bubrega kod zdravih svinja (Nietfeld i Leslie-Steen, 1993). Najčešći klinički znak povezan sa infekcijom PAdV je žuta, vodenasta dijareja sa prekidima u pojavljivanju. Takođe, životinje gube na težini i dehidrirane su. Povremeno, dijareja može biti praćena povraćanjem (SHC i CFSPH, 2015).



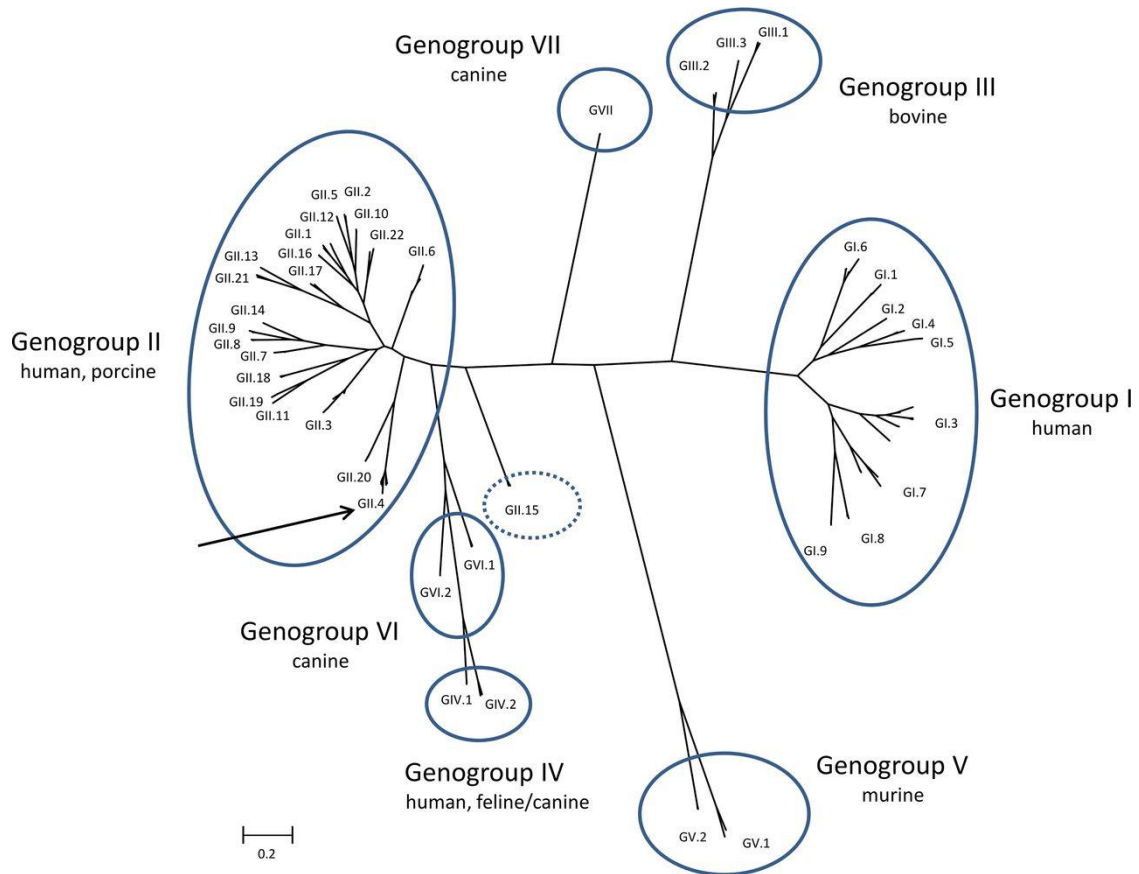
Adenovirusi svinja su predloženi za indikatore fekalne kontaminacije poreklom od svinja i veoma često se mogu otkriti u vodama u kojima postoji izvor ovakve kontaminacije (Hundesda i sar, 2006). PAdV se takođe koriste u istraživanju transfera gena i kao vektori u istraživanju vakcina (SHC i CFSPH, 2015).

2.4.2 *Caliciviridae*

Familija Caliciviridae obuhvata 5 rodova i 7 vrsta: rod *Lagovirus* (*European brown hare syndrome virus*, *Rabbit hemorrhagic disease virus*), *Nebovirus* (*Newbury-1 virus*), *Norovirus* (*Norwalk virus*), *Sapovirus* (*Sapporo virus*), *Vesivirus* (*Feline calicivirus*, *Vesicular exanthema of swine virus*) <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Rodovi *Norovirus* i *Sapovirus* su patogeni i izazivaju akutni gastroenteritis. Norovirus je prvi put prijavljen 1968. godine u gradu Norwalk, Ohio (Kapikian i sar, 1972). *Caliciviridae* su rasprostranjene širom sveta, a norovirusi su glavni uzrok epidemija ne-bakterijskog gastroenteritisa. Uobičajeni simptomi su mučnina, povraćanje i dijareja koji traju samo nekoliko dana. Način prenošenja je fekalno-oralnim putem (unošenje kontaminirane hrane ili vode), ali je moguće i prenošenje aerosolom i kapljicama sa osobe na osobu <http://www.viprbrc.org/brc/aboutPathogen.spg?decorator=calici#1>.

Norovirus (NoV) pripada porodici *Caliciviridae* i podeljen je na pet genogrupa (GI, GII, GIII, GIV i GV). Humani norovirusi pripadaju GI, GII i GIV genogrupama, dok GIII i GV genogrupama pripadaju norovirusi goveda i miševa (MNoV) (Stals i sar, 2012). Veličine su 27-35 nm sa jednolančanom RNK (Blacklow, 1996). Norovirusi su genetski veoma raznovrsni jer akumuliraju mutacije tokom replikacije (Lodder i de Roda Husman, 2005).

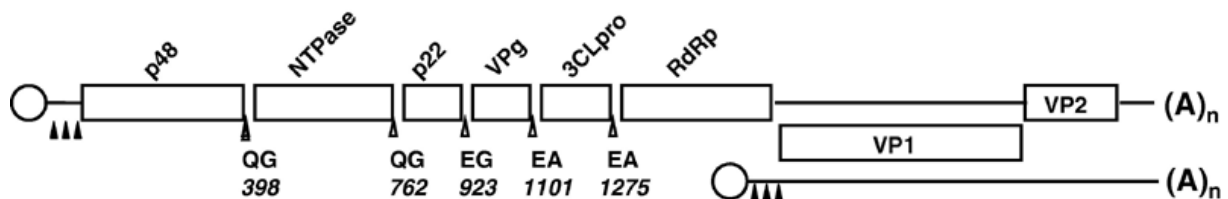
Vinje i sar. (2015) godine su objavili klasifikaciju norovirusa koja obuhvata 7 genogrupa GI do GVII na osnovu različitosti u sekvenci VP1 kapsidnog proteina. Za izradu filogenetskog stabla (Sl.4) su izabrali 105 sojeva. Kao što je naglašeno, virusi koji pripadaju GI, GII, a GIV su patogeni ljudi, osim GII.11, GII.18 i GII.19 virusa, koji inficiraju svinje, i GIV.2 viruse, koji inficiraju pse. Norovirusi tip GII.15 su otkriveni samo kod ljudi i formiraju novu genogrupu. Norovirusi GIII inficiraju krave i ovce, GIV.2 pse, GV.1 i GV.2 su patogeni miševa i pacova, a GVI i GVII inficiraju pse. Norovirusi GII.4 (označeni strelicom) su odgovorni za većinu norovirusnih infekcija širom sveta.



Slika 4. Filogenetsko stablo klasifikacije norovirusa po genogrupama
(Vinje i sar, 2015)

Ayukekbong i sar. (2015) su objavili da se rod *Norovirus* sastoji od najmanje 41 genotip, koji su klasifikovani u šest genogrupa (GI-GVI). Na osnovu sličnosti sekvence Vinje i sar. (2015) su objavili i dodatnu genogrupu VII. Svaka genogrupa je podeljena na genotipove ili geno klastere. Genogrupe i genotipovi norovirusa su označeni brojačno, genogrupe rimskim, a genotipovi arapskim brojevima (Ayukekbong i sar, 2015).

Genom norovirusa čini pozitivno orijentisana jednolančana RNK. Genom je veličine 7,7 kb i sastoji se od tri otvorena okvira za čitanje (ORF). ORF1 kodira nestrukturane proteine uključujući: p48, p41 (NTPase), p22, VPG, 3CL^{pro} i RdRp. ORF2 kodira glavni kapsid protein VP1, dok ORF3 kodira mali strukturni kapsid proteina VP2 (SI.5) (Hardy, 2005).



Slika 5. Organizacija genoma humanog norovirusa
(Hardy, 2005)

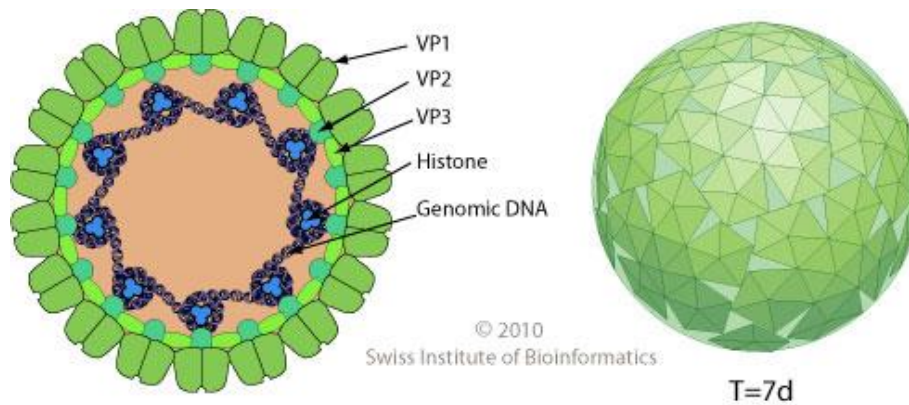


Norovirusi su čest uzrok epidemije gastroenteritisa, jer manje od 10 virusnih čestica mogu da dovedu do infekcije i bolesti (Atmar, 2010; Teunis i sar, 2008). Epidemije gastroenteritisa su posledica izloženosti kontaminiranoj hrani, vodi i međusobnog kontakta dve osobe od kojih je jedna inficirana, dok je njihov primarni put prenosa fekalno-oralni (Atmar, 2010). Do infekcije može doći aerosolom pa su veoma česte epidemije u ustanovama kao što su bolnice, dečija obdaništa, hoteli, brodovi za krstarenje i dr. (Taylor, 2011). Konzumiranje sirovih školjki, salate i voća, kao i rukovanjem njima u nehigijenskim uslovima može dovesti do bolesti (Blacklow, 1996). Do infekcije može doći u bilo koje doba godine, ali su najčešće u hladnim, zimskim mesecima (da Silva i sar, 2007). Karakteristični simptomi infekcije norovirusom su: mučnina, povraćanje, bolovi u stomaku, dijareja, glavobolja, bol u mišićima. Povraćanje se češće javlja kod dece, dok kod odraslih je prisutnija dijareja. Simptomi obično traju 1-3 dana (Medici i sar, 2005).

Norovirusi su detektovani u otpadnim vodama i pokazali su se otporni na tretmane prečišćavanja otpadnih voda (van den Berg i sar, 2005; da Silva i sar, 2007). Brojne studije su pokazale da su enterični virusi prisutni u visokom nivou u otpadnim vodama i nakon tretmana (Laverick i sar, 2004; van den Berg i sar, 2005; Da Silva i sar, 2007; Katayama i sar, 2008; Haramoto i sar, 2009). Epidemiološke studije norovirusa su često fokusirane na zimske mesece, međutim neophodno je utvđivati prevalencu norovirusa tokom cele godine (Nordgren i sar, 2008).

2.4.3 Polyomaviridae

Prema važećoj taksonomiji ICTV (2015) familija *Polyomaviridae* obuhvata četiri roda sa 73 vrste: *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Deltapolyomavirus* i *Gammapolyomavirus*, kao i 3 vrste koje nisu svrstane u rodove: *Bos taurus polyomavirus 1* (ranije *Bovine polyomavirus*; *BPyV*), *Centropristis striata polyomavirus 1* i *Delphinus delphis polyomavirus 1*. Virion poliomavirusa je veličine 40-45 nm (MacLachlan i Dubovi, 2011). Ikozaedarni kapsid se sastoji od 72 kapsomere. Kapsid okružuje dvolančanu DNK, koja je skoro ujednačene veličine kod svih rodova u okviru porodice, u proseku je oko 5 kbp (Johnie i sar, 2011). Kompletan virion sadrži sedam različitih proteina, od kojih su četiri ćelijski histoni u vezi sa DNK, a tri su kodirajuća proteina VP1, VP2 i VP3. VP1 je glavni kapsid protein (Sl.6) (Rayment i sar, 1982).



Slika 6. Šematski prikaz čestice poliomavirusa
(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/148.html, 10.05.2015.)

Poliomavirusi goveda su zastupljeni u veoma različitim geografskim oblastima i prisutni su tokom cele godine (Hundesda i sar, 2006). Prema do sada dostupnim podacima, uglavnom ne dovode do kliničkih znakova bolesti. Visoka koncentracija BPyV u uzorcima vode koje se nalaze daleko od izvora ispuštanja otpadnih voda podržava hipotezu da su ovi virusi relativno otporni na nepovoljne uslove životne sredine (Hundesda i sar, 2010).

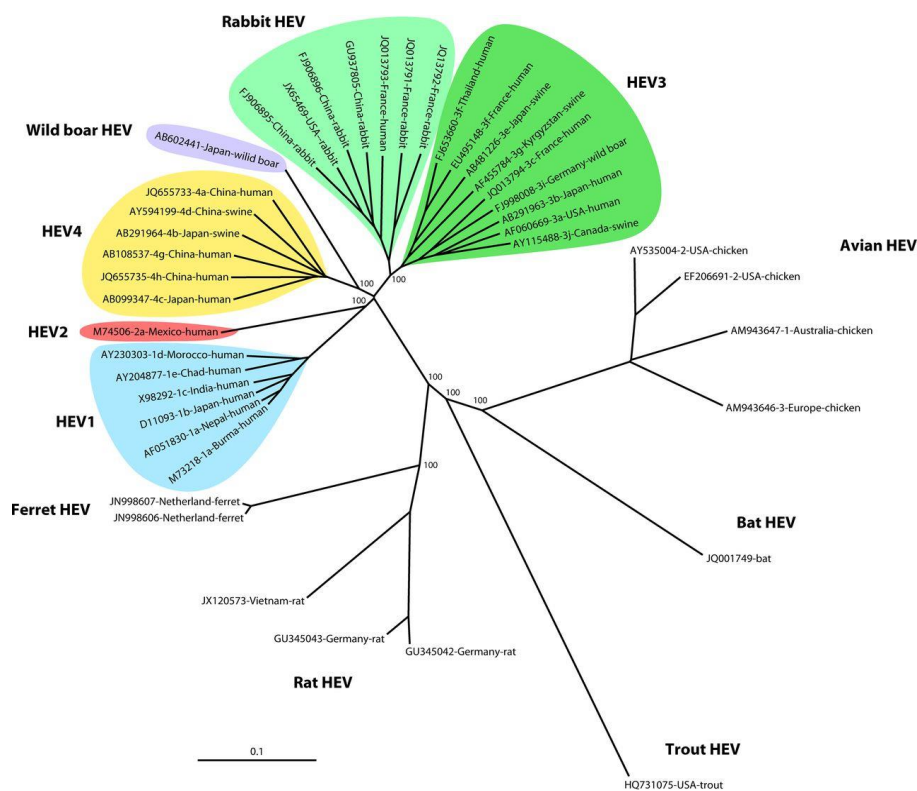
Iako BPyV ne dovode do klinički teških bolesti goveda, oni su predloženi za indikatore fekalne kontaminacije poreklom od goveda (Hundesda i sar, 2006; Girones i sar, 2010; Girones i Bofill-Mas, 2013). Njihov značaj u biotehnologiji je veliki, jer prisustvo BPyV u fetalnom i telećem serumu predstavlja ozbiljan rizik za kontaminaciju proizvoda u humanoj terapiji. Takođe, ovaj virus pripada porodici virusa koja ima potencijal indukovanja maligniteta (Nairn i sar, 2003). U uzorcima iz životne sredine gde postoji izvor fekalne kontaminacije poreklom od goveda, BPyV se češće pronalaze od adenovirusa goveda (BAdV) (Hundesda i sar, 2006; Girones i Bofill-Mas, 2013; Petrovic, 2013). Jedna od prednosti korišćenja ovih virusa za monitoring fekalne kontaminacije je što su domaćin-specifični. Takođe, pokazalo se da je potrebno oko 130 dana inkubacije na 20°C u kanalizaciji da bi se inaktivisalo 99,0 % HAdV i HPyV (Bofill-Mas i sar, 2006; Wong i Xagorarakis, 2011). Osnovni nedostatak je niska koncentracija u životnoj sredini (Wong i Xagorarakis, 2011). Istraživanja Rusinol i sar. (2014) su potvrdila da je u Švedskoj u ruralnom području, gde je velik uzgoj goveda, utvrđena visoka koncentracija BPyV u svim godišnjim dobima. Virus ljudi i goveda se ne replikuju van domaćina, tako da je za njihovo prisustvo u životnoj sredini bitan samo opstanak i inaktivacija. Opstanak u površinskoj vodi je kraći u odnosu na podzemne vode



zbog izloženosti UV svetlosti, višim temperaturama i interakcijama sa drugim mikroorganizmima (Corsi i sar, 2014).

2.4.4 Hepeviridae

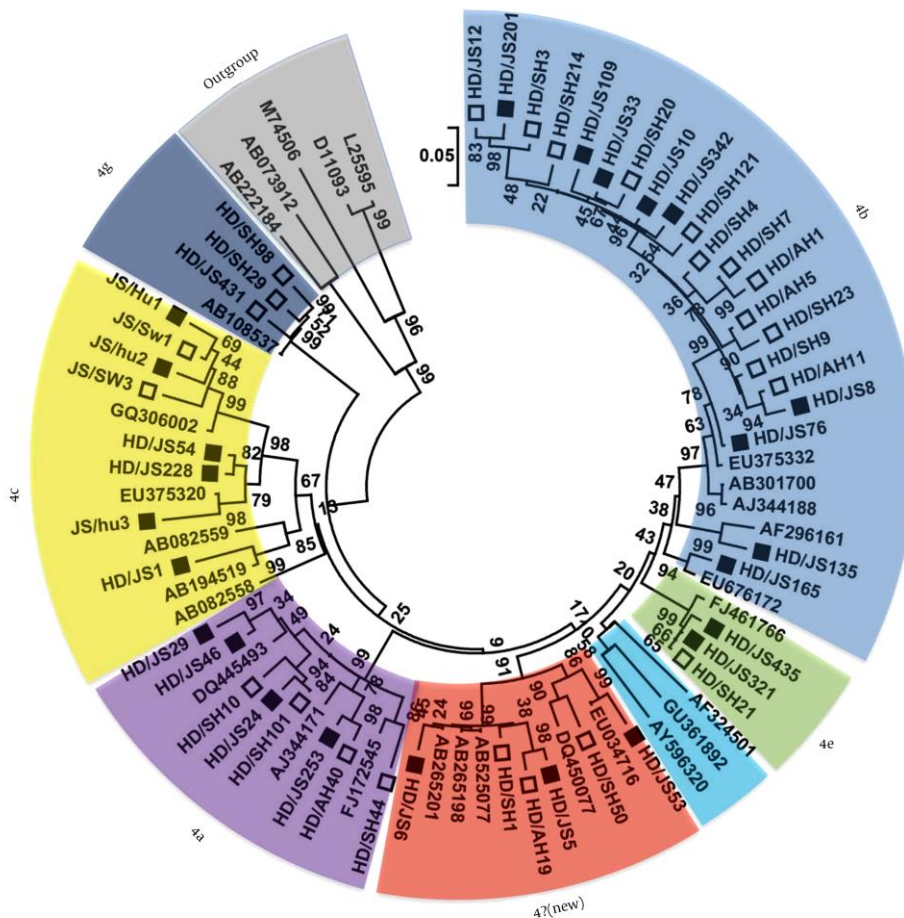
Virus hepatitisa E je uzrok epidemija akutnog hepatitisa a ponekad može biti fatalnog ishoda kod ljudi (MacLachlan i Dubovi, 2011). Hepatitis E virus (HEV) je prvobitno klasifikovan u porodicu *Caliciviridae*, ali je kasnije klasifikovan u rod *Hepevirus* i porodicu *Hepeviridae* (Ahmad i sar, 2010). Prema važećoj taksonomiji ICTV iz 2014. godine porodica *Hepeviridae* obuhvata 2 roda: *Orthohepevirus* i *Piscihepevirus*. Rod *Orthohepevirus* čine četiri vrste: *Orthohepevirus A* (ranije Hepatitis E virus - HEV), *Orthohepevirus B*, *C* i *D*. Četiri glavna genotipa hepatitisa E virusa su prijavljena širom sveta. Genotip 1 je zastupljen prvenstveno u Azijskim zemljama, genotip 2 je izolovan u Meksiku, genotip 3 je identifikovan kod svinja i ljudi u SAD i mnogim drugim zemljama, i genotip 4 koji je identifikovan kod ljudi, svinja i drugih životinja u Aziji (Jothikumar i sar, 2006). Takođe, prijavljeni su i HEV kod pacova, divljih svinja, slepih miševa, pastrmki i lasica (Sl.7) (Kamar i sar, 2014).



Slika 7. Filogenetsko stablo hepatitis E virusa
(Kamar i sar, 2014)



Od 2000. godine genotip 4 HEV je postao dominantan uzrok bolesti i infekcija hepatitisa E virusa u Kini. U istraživanju Tian i sar. (2015), u filogenetskom stablu (Sl.8) je prikazano 49 sojeva iz pomenutog istraživanja, kao i ostali sojevi su preuzeti iz GenBank.



Slika 8. Filogenetsko stablo izolata hepatitis E virusa genotip 4 u Istočnoj Kini (Tian i sar, 2015).

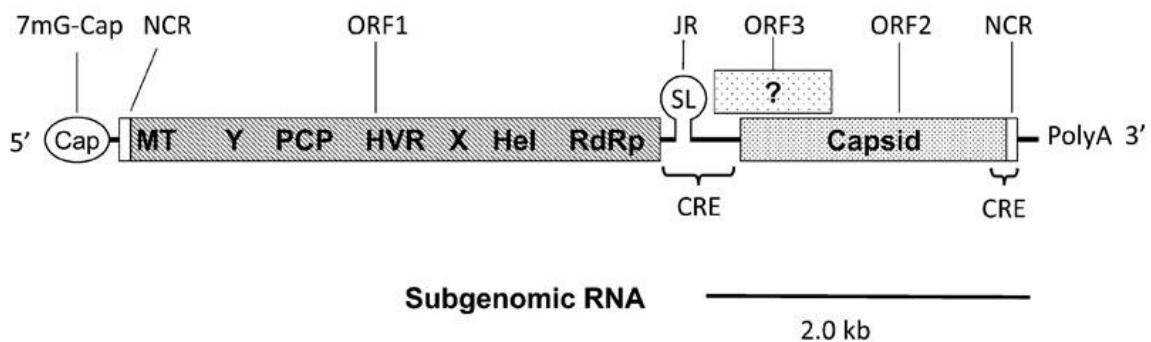
Legenda: Beli kvadrati - sekvence svinja, crni kvadrati - sekvence ljudi, ostali sojevi su iz GenBank

Hepatitis E virus ima male virione ikozaedarne simetrije, bez omotača, veličine 27-34nm. Virion se sastoji od jednog kapsidnog proteina. Genom čini jednolančana pozitivno orijentisana RNK od 7,2 kb (WHO, 2014). RNK se se sastoji od 3 otvorena okvira za čitanje (*Open reading frames*): ORF 1, ORF 2 i ORF 3, kao i kratkog 5' kraja na kojem se nalazi nekodirajući region (5' NCR) i 3' kraja sa nekodirajućim regionom (3' NCR) (Sl.9). Na 5' kraju virusnog genoma je *Cap* struktura koja verovatno ima ulogu u započinjanju HEV replikacije. Otvoreni okvir za čitanje 1 sadrži nekoliko funkcionalnih domena: MT (domen za blokiranje 5' kraja), Y (nepoznata funkcija), PCP (*papain-like cysteine protease*), HVR (hiper varijabilni region), X (nepoznata funkcija), HeL (helikaze) i RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase* -



domen koji je odgovoran za virusnu replikaciju). Otvoreni okvir za čitanje 2 kodira protein kapsida od 660 aminokiselina koji je odgovoran za interakciju sa ciljnim ćelijama i imunogenost. Otvoreni okvir za čitanje 3, koji preklapa ORF2, kodira mali protein od 113 ili 114 aminokiselina i uključen je u morfogenezu i oslobađanje viriona. U genomu se uočavaju „*junction region*“ (JR) i dva Cis reaktivna elementa (CRE). Jedan CRE je neophodan za replikaciju i preklapa se sa ORF2 i nekodirajućim regionom na 3' kraju. Drugi CRE se nalazi u JR i služi kao promoter za subgenomsku iRNK (Cao i Meng, 2012; Kamar i sar, 2014).

Genomic RNA



Slika 9. Struktura genoma Hepatitis E virusa
(Cao i Meng, 2012)

Hepatitis E dovodi do epidemije akutnog hepatitisa u zemljama u razvoju, naročito u tropskim i subtropskim regionima sveta gde je epidemija obično povezana sa fekalnom kontaminacijom vode za piće (Ahmad i sar, 2010). Uzročnik je velikih epidemija akutnog hepatitisa u Indiji, centralnoj i jugoistočnoj Aziji, Bliskom istoku, delovima Afrike. Ovaj virus je odgovoran za visok mortalitet trudnica (15-20%), naročito u trećem tromesečju tokom trudnoće (Zuckerman, 1996). Nekoliko epidemija hepatitis E virusa su povezane sa poplavama nakon jake kiše, koja spira fekalne materije u reke i druge površinske vode. Neke epidemije koje su prijavljene tokom sušne sezone verovatno su u vezi sa povećanom koncentracijom zagađujućih materija u rekama u kojima je smanjen protok vode. Oštećenja na vodovodnim cevima koje prolaze kroz zemlju zagađenu fekalnim materijama mogu dovesti do kontaminacije vode za piće (WHO 2014).

Infekcija virusom hepatitis E je najčešća u uzrastu od 15. do 40. godine života. Tipični znaci i simptomi hepatitisa su: žutica (žuta diskoloracija kože i beonjače očiju, taman urin i bleđa stolica), anoreksija (gubitak apetita), uvećana jetra (hepatomegalija), osetljivost i bol u



trbuhu, mučnina, povraćanje i groznica. Kod trudnica je povećan rizik od komplikacija i stopa smrtnosti je 20% među trudnicama u trećem trimestru (WHO 2015). Komplikacije u trudnoći sa istovremeno prisutnom infekcijom HEV dovode do smrti i majke i fetusa, abortusa, prevremeneog porođaja i smrti bebe ubrzo nakon rođenja. Prenosjenje ovog virusa sa majke na fetus je prijavljeno u 33% slučajeva. Takođe, RNK HEV je otkrivena i u kolostrumu (Yugo i Meng, 2013). Većina HEV infekcija je bez simptoma, a samim tim može proći nezapaženo (Petrovic i sar, 2014b). Međutim, broj kliničkih slučajeva je u porastu u nekim zemljama (Pina i sar, 2000). Simptomi infekcije su veoma česti i kod male dece (Pond, 2005). Iako se HEV prenosi fekalno-oralnim putem, nije uobičajeno da se prenosi sa osobe na osobu (Jothikumar i sar, 2006).

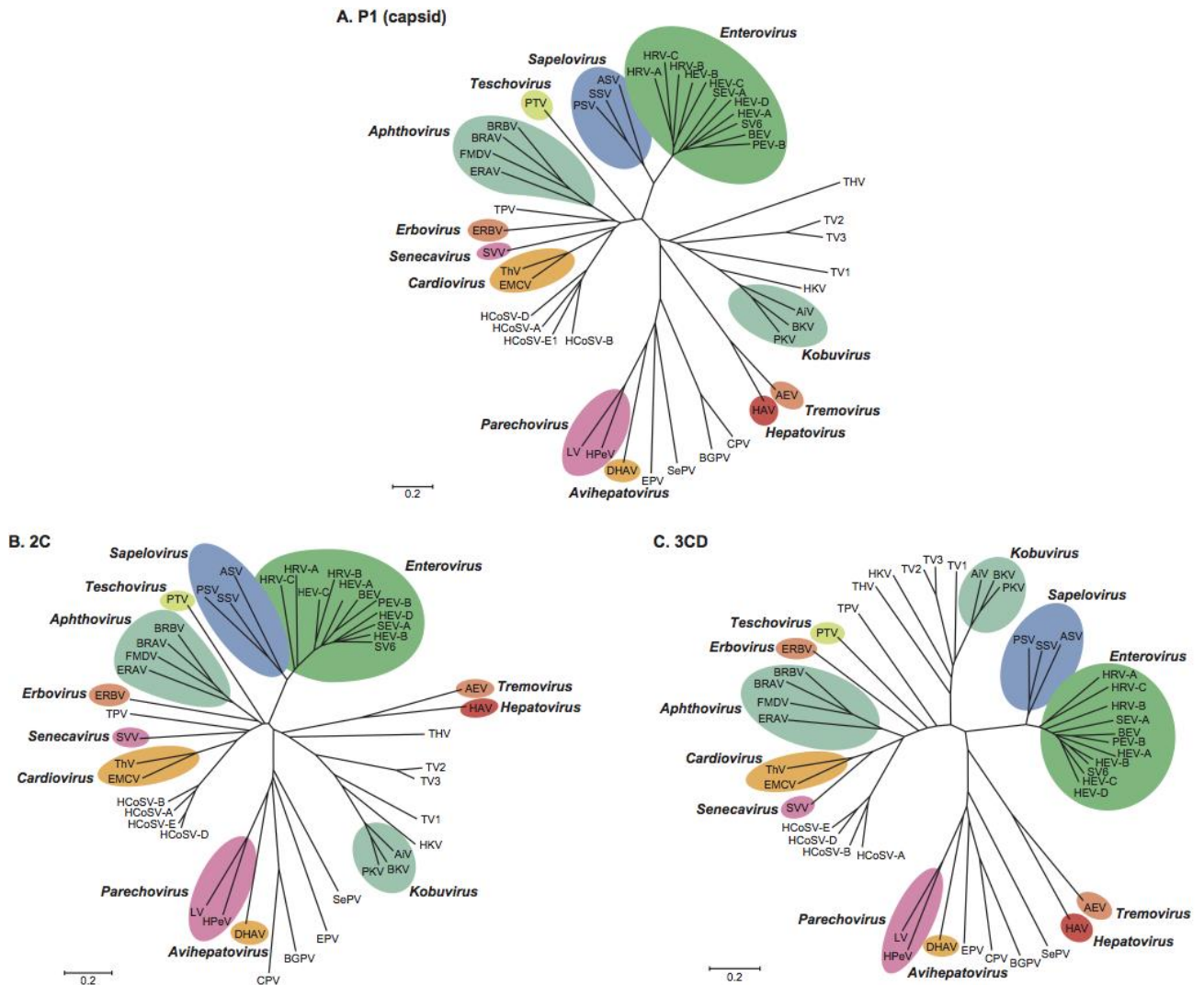
Infekcija hepatitis E virusom je veoma rasprostranjena kod domaćih svinja u Vojvodini, u Srbiji (Lupulovic i sar, 2010). Kontaminacija vode sa otpadom životinjskog porekla predstavlja još jedan važan izvor prenošenja virusa na ljude i životinje koje konzumiraju kontaminirane vode (Pond, 2005). Genotip 3 hepatitis E virusa u Mađarskoj je endemskog karaktera. Smatra se da su domaće svinje glavni rezervoar ovog virusa (Reuter i sar, 2009). Kod inficiranih osoba HEV se izlučuje fekalnim putem. Pre pojave simptoma bolesti do 10^8 genomskih kopija virusa hepatitisa E po miligramu fecesa može da se izluči za nekoliko dana. Kod svinja, HEV je detektovan i u urinu što može da ukaže da je i prenošenje virusa aerosolom takođe moguće, ali do sada još nisu prijavljeni takvi slučajevi prenosa HEV. Za virus hepatitisa E često je veoma teško da se utvrdi izvor zaraze zbog dugog perioda inkubacije do 60 dana. Razmnožavanje HEV na kulturama ćelija je teško. Da li će doći do infekcije HEV zavisi od nivoa kontaminacije, stabilnosti i infektivne doze HEV. Ovi uslovi takođe, mogu biti različiti za različite genotipove HEV (Van der Poel, 2014). Svetska zdravstvena organizacija (SZO) procenjuje da se svake godine pojavljuje 20 miliona novih infekcija hepatitis E virusom, preko tri miliona su akutni slučajevi a smrtnih slučajeva je preko 57.000 (Iaconelli i sar, 2015).

2.4.5 Picornaviridae

Prema ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) nomenklaturi red *Picornavirales* ima 5 porodica. Porodicu *Picornaviridae* čini 31 rod i 54 vrste. Na slici 10. su



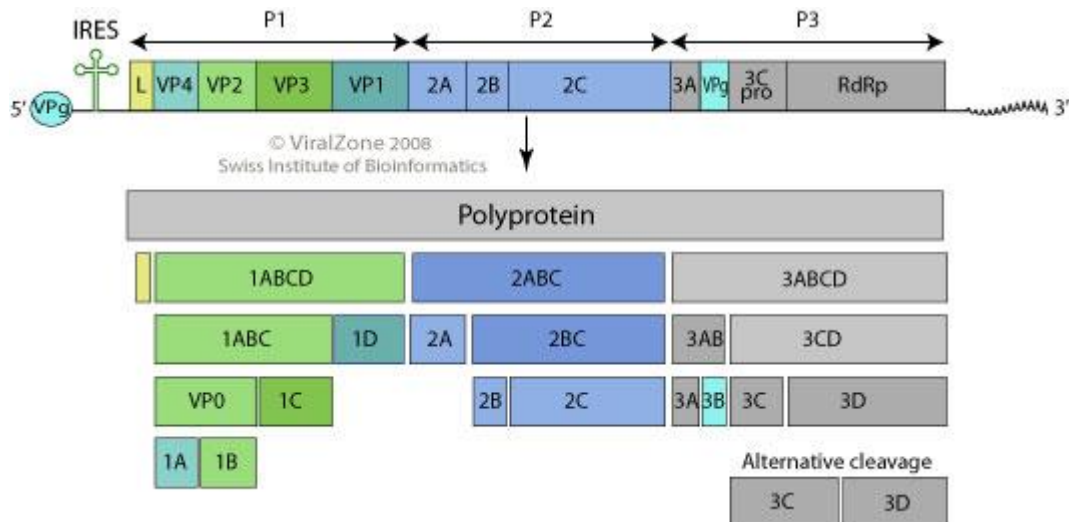
prikazana filogenetska stabla koja pokazuju odnose između rodova i vrsta familije *Picornaviridae*.



Slika 10. Filogenetska stabla porodice *Picornaviridae* (ICTV)

Legenda: A.P1 - proteina P1, B.2C - protein 2C, C.3CD - proteini 3C + 3D

Virioni pikornavirusa su bez omotača, približno prenika 30 nm, ikosaedarne simetrije. Genom čini jednolančana, pozitivno orijentisana RNK veličine 7-8,8 kb (MacLachlan i Dubovi, 2011). Na slici 11. je prikazan šematski prikaz genoma pikornavirusa, kombinujući funkcije iz svih rodova. Genom čini 12 polipeptida koji čine 3 glavna proteina: P1 (protein kapsida), P2 i P3 su ne strukturni proteini (Whitton i sar, 2005).



Slika 11. Šematski prikaz genoma pikornavirusa
(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/33.html, 10.08.2016)

Hepatitis A virus (HAV) pripada rodu *Hepatovirus* i familiji *Picornaviridae*. Prema ICTV klasifikaciji iz 2014. godine ime vrste je Hepatovirus A (uobičajeno ime vrste - hepatitis A virus). Infekcija HAV je vodeći uzrok akutnog virusnog hepatitisa širom sveta (Costafreda i sar, 2006). Najčešće se javlja u tropskim i suptropskim krajevima sveta (Pond, 2005). Primarno mesto replikacije HAV je jetra, pri čemu ovaj virus najčešće izaziva akutne bolesti jetre širom sveta. Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da se više od 1,5 miliona kliničkih slučajeva javljaju svake godine u svetu (Vaughan i sar, 2014). Poznato je šest genotipova HAV (I-VI) od koji su genotipovi I, II i III humanog porekla (Taylor, 2011). Genom HAV čini jednolančana pozitivno orijentisana RNK molekularne mase od 7.5 kb. Genom se sastoji od jednog otvorenog okvira za čitanje (ORF), 5'-nekodirajućeg regiona (5' NCR) i 3'-nekodirajućeg regiona (3' NCR) na kome se nalazi poly(A) rep. Svi RNK virusi iz ove familije nemaju CAP (od eng. catabolite gene activator protein), pa usled toga sekundarna struktura 5'NCR ima veoma važnu ulogu u inicijaciji translacije (Vaughan i sar, 2014).

Hepatitis A virus se najčešće prenosi sa čoveka na čoveka, ali je veoma čest način prenošenja i fekalno-oralni put (Jothikumar i sar, 2005). Uzrok epidemija je najčešće fekalna kontaminacija vode i hrane. Jedna od epidemija zabeležena u Šangaju 1988. godine, povezana je sa konzumiranjem školjkama, rezultirala je sa skoro 300.000 slučajeva infekcije HAV-om (Zuckerman, 1996). Hepatitis A virus je otporan na intestinalne enzime i može opstati na temperaturi do 60°C i do 10 sati. Takođe, u vodi, kanalizaciji i školjkama ostaje stabilan na sobnoj temperaturi mesecima (Pond, 2005). Hepatitis A virus je postojan



i na povrću do 10 dana, a pranje povrća nije uvek garancija uklanjanja virusa. Samim tim, efikasne mere kontrole za sprečavanje HAV infekcije su bolja lična higijena i adekvatno sprečavanje fekalne kontaminacije hrane i vode (Taylor, 2011). Hepatitis A virusi predstavljaju opasnost po zdravlje u nekoliko južnih mediteranskih zemalja i uzrok su značajnog morbiditeta kako u razvijenim, tako i u nerazvijenim zemljama (Beji-Hamza i sar, 2014). Kod dece mlađe od 5 godina infekcija je asimptomatska, dok se kod starijih javljaju simptomi kao što su: groznica, malaksalost, mučnina, anoreksija, povraćanje i povišena temperatura (Pinto i sar, 2010; Hussain, 2011). Oboljenje uzrokovano HAV ima period inkubacije od oko četiri nedelje (Zuckerman, 1996).

Samo kod oko 25% pacijenata se javlja žutica između dva i sedam dana nakon prodromalne faze bolesti. Prvi znaci žutice se uočavaju u urinu i stolici. Takođe, može da se javi žuta boja beonjača i hepatomegalija. Pacijent je infektivan sedam dana nakon početka žutice. Recidiv hepatitisa se javlja kod 6 do 10 % slučajeva. Fulminantan hepatitis je najteži oblik infekcije i smrtnost se javlja kod 80% slučajeva, ali je veoma redak (manje od 1% od svih slučajeva). Insuficijencija jetre je najteža komplikacija, ali je prognoza u većini slučajeva veoma povoljna. Samo u retkim slučajevima insuficijencija može da napreduje i tada je neophodna transplantacija jetre. Takođe, kao komplikacija može da se javi iolestaza i tada se bolest karakteriše upornom žuticom, povezanom sa pruritisom, anoreksijom i gubitkom težine. Ekstrahepatične manifestacije hepatitisa A podrazumevaju privremeni osip i artralgiu. Međutim, dokumentovani slučajevi su veoma retki (Schiff, 1992; Pond, 2005).

Infekcija hepatitis A virusom i danas predstavlja problem za javno zdravlje ljudi u zemljama u razvoju širom sveta. Kako se uglavnom javlja usled nehigijenskih i loših sanitarnih uslova, naglašena je potreba za poboljšanje mera u cilju sprečavanja epidemije hepatitis A virusa i zaštite javnog zdravlja ljudi (Hussain, 2011). U svetu, svake godine se javi oko 1,4 miliona slučajeva infekcije hepatitisa A sa različitim epidemiološkim i kliničkim znacima (Iaconelli i sar, 2015).

2.5 PRISUSTVO I RAŠIRENOST VIRUSA U VODI

Procenjuje se da 884 miliona ljudi, ili 1/6 stanovništva na celom svetu nemaju pristup kvalitetnim izvorima vode za piće i da loš kvalitet vode sa ograničenim sanitarnim i



neadekvatnim higijenskim uslovima dovodi do pojave 3,5 milijardi slučajeva dijareje tokom godine koje prouzrokuju 1,87 miliona smrtnih slučajeva godišnje kod dece širom sveta. Od kasnih 1970. godina u Sjedinjenim Američkim Državama smatra se da je voda glavno sredstvo u prenošenju virusnih oboljenja (Fong i Lipp, 2005). Iako se mnogi patogeni u otpadnim vodama uklanjaju sistemima za prečišćavanje, mnogi od njih dospevaju u recipijente nakon prečišćavanja. Virusi koji se prenose putem kontaminirane hrane ili vode obično su veoma stabilni u vodi (Boffil-Mas i sar, 2013).

Površinske vode su izložene različitim izvorima kontaminacije. Pored izlivanja otpadnih voda sa farmi i drugih izvora zagađenja (industrijskih i hemijskih), veoma važan uticaj ima i antropogeni faktor. Kod inficiranih osoba fecesom se izlučuju enterični virusi i drugi patogeni. Virusi ne mogu da se replikuju izvan tkiva njihovog domaćina pa samim tim ne mogu da se razmnožavaju u životnoj sredini. Međutim, virusi mogu opstati u životnoj sredini duži vremenski period, čak duže od većine intestinalnih bakterija. Poznato je da virusi mogu opstati i biti infektivni i do 130 dana u morskoj, do 120 dana u slatkoj vodi i čak do 100 dana u zemljištu (La Rosa i sar, 2012). Virusi se mogu preneti na različite načine: direktnim i indirektnim kontaktom i putem vektora. Mnogi humani i animalni virusi se prenose respiratornim (aerosolom), fekalno-oralnim putem (voda, hrana) i preko životne sredine. Virusi koji se prenose na ovaj način i koji perzistiraju u životnoj sredini, predstavljaju potencijalni rizik za pojavu infekcija i bolesti kod ljudi i životinja (Sobsey i Meschke, 2003). Kritičan faktor transmisije virusa je njegova sposobnost da preživi u okruženju (Vasickova i sar, 2010). Najrelevantniji faktori koji utiču na opstanak virusa u vodi su temperatura, veza virusa sa čvrstim česticama u vodi i izlaganje UV zracima. Uticaj temperature na postojanost virusa može biti povezana sa denaturacijom proteina, oštećenjima RNK, enzimskom aktivnosti. Iako svi virusi bolje perzistiraju na nižim temperaturama, neki virusi, kao što je hepatitis A virus, pokazuju veću temperaturnu otpornost (Bosch i sar, 2006). Virusi imaju mnogo različitih karakteristika pa im je i stopa preživljavanja u vodi drugačija. Vremenom, infektivnost nekih čestica virusa u životnoj sredini se smanjuje ali metodama koncentrovanja i purifikacije može se detektovati i veoma mala brojnost virusa u vodi, što je veoma bitno zbog njihove niske infektivne doze (Lodder i sar, 2015). Iako se ovi virusi neprekidno ispuštaju u životnu sredinu, broj virusnih čestica koje su prisutne u površinskoj vodi je ipak generalno mali i stoga je nophodno analizirati veću količinu vode (Lodder i sar, 2010).



Nekoliko enteričnih virusa, kao što su norovirusi, adenovirusi, hepatitis A virusi, ehovirusi i koksaki virusi, opisani su kao patogeni koji se prenose vodom (Sinclair i sar, 2009). Članovi familije *Picornaviridae* od posebnog su interesa jer pored gastroenteritisa, mogu da izazovu teža oboljenja kao što su meningitis, miokarditis, paralize i hepatitis. Infekcije ovim virusima često ostaju asimptomatske ili izazivaju blage kliničke manifestacije, a osim toga sekundarno prenošenje sa osobe na osobu može prikriti početnu infekciju izazvanu ingestijom zagađene vode. Kod infekcija izazvanih prenošenjem virusa iz rekreativnih voda deca su u znatno većem riziku i kod njih se češće javljaju oboljenja nego kod odraslih (Lodder i sar, 2015).

Sistemi za prečišćavanje otpadnih voda, čak i kada funkcionišu punim kapacitetom, mogu da uklone samo oko 20-80% enteričnih virusa, dok značajna koncentracija se kasnije nađe u rekama, podzemnim i otpadnim vodama, u zavisnosti od toga gde se ispušta voda nakon tretmana prečišćavanja. Brojnost enteričnih virusa u vodi varira u zavisnosti od toga da li je izvor zagađenja kontinuiran ili je posledica naglog i kratkotrajnog priliva fekalne kontaminacije (La Rosa i sar, 2012). Na primer, sirova urbana kanalizaciona voda može da dospe u površinske vode i tokom obilnih padavina. Pošto se enterični virusi izlučuju u visokim koncentracijama kod inficiranih osoba, sirova kanalizaciona voda može da sadrži visoku koncentraciju ovih virusa. Tretirana kanalizaciona voda se ispušta u površinske vode, a u zavisnosti od primenjenih procesa tretmana, ona ipak može da sadrži veliku brojnost virusa (Lodder i sar, 2010).

Izvori vode za piće mogu biti podzemne ili površinske vode. Površinske vode su više kontaminirane patogenim mikroorganizmima, iako su virusi takođe otkriveni i u podzemnim vodama. Efikasnost naprednih procesa za prečišćavanje vode za piće značajno se razlikuju u pogledu uklanjanja ili inaktivacije mikroorganizama iz otpadnih voda. Bakterije se lakše inaktiviraju hlorisanjem nego protoze, dok virusi mogu biti uklonjeni ili inaktivisani sporim filtriranjem kroz pesak i zemljište, ali su otporniji na UV zračenje i metodu koagulacije u kombinaciji sa sedimentacijom (Lodder i de Roda Husman, 2005).

Virusi nakon ispuštanja u životnu sredinu bivaju podvrgnuti različitim fizičkim, hemijskim, biološkim i drugim faktorima koji za viruse mogu biti inaktivacioni ili degradirajući. Samim tim, favorizuju se najizdržljiviji sojevi koji tada imaju veliku verovatnoću inficiranja životinja i ljudi preko vode (Skraber i sar, 2005). Prisustvo HAdV, PAdV, i poliomavirusa ljudi i



životinja može biti vrlo koristan alat za praćenje izvora fekalne kontaminacije u okruženju i u vodi (Hundesda i sar, 2006).

2.5.1 Virusi ljudi

2.5.1.1 Humani adenovirusi

Procenjeno je da je više od 90% populacije ljudi seropozitivno na jedan ili više tipova adenovirusa (Kokkinos i sar, 2015). Adenovirusi se nalaze svuda u životnoj sredini gde postoji kontaminacija ljudskim fekalijama ili kanalizacionom vodom i zastupljeni su širom sveta (Pond, 2005). Humani adenovirusi se izlučuju u visokim koncentracijama kod inficiranih pacijenata (do 10^{11} virusnih čestica po gramu fecesa). U odnosu na ostale enterične viruse HAdV se češće detektuju u otpadnoj vodi (Hundesda i sar, 2009; Kokkinos i sar, 2015).

Humani adenovirusi su predloženi za indikatore prisustva virusnih patogena ljudi u vodi i životnoj sredini. Prisustvo ovog virusa preovladava u vodi i školjkama u odnosu na enteroviruse, stabilan je u vodenoj sredini i visoko otporan na UV zračenje. U SAD u Agenciji za zaštitu životne sredine, adenovirusi su uključeni na listu kao drugi najznačajniji uzrok izbijanja epidemija čiji su uzrok virusi u vodi za rekreaciju (Sinclair i sar, 2009; Bofill-Mas i sar, 2010). Prva epidemija faringokonjuktivitisa uzrokovana vodom za rekreaciju prijavljena je 1953. godine (Sinclair i sar, 2009). Foy i sar. (1968) su objavili epidemiju faringokonjuktivitisa u dva dečija plivačka tima koji su bili izloženi nehlorisanoj vodi. Najmanje 80 plivača u Grčkoj 1995. godine je imalo simptome groznice, upale grla, konjuktivitisa, glavobolje i bola u stomaku. Pokazano je epidemija bila zbog adenovirusa u slabo hlorisanoj vodi u bazenu (Papapetropoulou i Vantarakis, 1998; Pond, 2005). Isti razlog je bio i za epidemiju u Australiji 2000. godine kao i u SAD. Jedanaest epidemija je uzrokovano vodom iz bazena, a dve iz jezera i ribnjaka. Najveća epidemija faringokonjuktivitisa je bila u Severnoj Karolini 1991. godine, kada je prijavljeno 595 slučajeva infekcije adenovirusom. Ukupan morbidited svih epidemija adenovirusa je bio 1.648 (Sinclair i sar, 2009).



Prisustvo HAdV u uzorcima vode Buffalo reke u Brazilu predstavlja značajan javno zdravstveni problem. Humani adenovirus je otkriven u 25 od 72 uzoraka (34,7%). Čak 83,3% (5/6 uzoraka) detektovanih HAdV pripadaju serotipovima 40 i 41. Nije uočen značajan sezonski trend HAdV jer su svi uzorci sakupljeni svakog meseca tokom jedne godine. Ovi zaključci su u skladu sa istraživanjima Kozyra i sar. (2011) gde je HAdV detektovan u 28,3% uzoraka vode iz reka u Jugoistočnoj Poljskoj i virusi su bili prisutni u svim godišnjim dobima. Međutim, Silva i sar. (2010) su detektovali HAdV u 44,4% (24 od 54) uzoraka sakupljenih iz reka i jezera koji se koriste za rekreaciju i kao izvor za snabdevanje pijaćom vodom grada Goiania u Brazilu, pri čemu su ustanovili da je pojava HAdV pokazala sezonski karakter (Chigor i Okoh, 2012a).

Tokom jedne nedelje intenzivnog istraživanja 2005. godine i periodično od 2005. do 2007. godine u Mičigenu, sakupljeno je 42 uzorka vode iz reke Grand. Humani adenovirus je detektovan u 14 uzoraka i brojnost HAdV je bila iznad granice detekcije (Fong i sar, 2010). Brojnim studijama je ukazano da postoji veza između izolata virusa iz životne sredine i izolata iz kliničkih uzoraka u datoj godini i u određenoj geografskoj oblasti (Sedmak i sar, 2003). Mnoga istraživanja su dokazala da adenovirus serotip 41 preovladava u uzorcima kanalizacione vode, a nakon njega i serotipovi 12, 40, 2 i 3, što može da ukaže na to da serotip 41 ima veću otpornost u uslovima životne sredine. Globalno u etiologiji gastroenteritisa kod dece adenovirusi grupe F (serotipovi 40 i 41) su najčešći. Istraživanja u Mičigenu su pokazala da je HAdV prisutan i u rekama u koje se uliva otpadna voda, da ne postoji sezonski trend, kao i da detekcija HAdV u površinskim vodama ukazuje na fekalnu kontaminaciju i nedostatak efikasnog tretmana prečišćavanja otpadnih voda (Fong i sar, 2010).

U jednoj studiji, na lokalitetima u 16 država ukupno je uzorkovano 1410 uzoraka vode. Ukupno 513 (36,4%) uzoraka je bilo pozitivno na jedan ili više serotipova HAdV (Wyn-Jones i sar, 2011). Od decembra 2007. do novembra 2008. godine u gradu Gioana u Brazilu adenovirus je detektovan u 43% (24/54) uzorka površinskih voda (Wyn-Jones i sar, 2011). U Mađarskoj je ispitano 129 uzoraka sa 42 lokaliteta: 13 bazena, 6 rečnih plaža, 2 sirove kanalizacione vode, 1 uzorak tretirane kanalizacione vode i 19 drugih površinskih voda. U 127 uzoraka je detektovan HAdV (Kern, 2014).



2.5.1.2 Norovirusi

Norovirusi su detektovani u gradskim kanalizacionim vodama jer primarni i sekundarni procesi tretmana otpadnih voda neefikasno smanjuju brojnost virusa, u odnosu na tercijarne procese. U zavisnosti od toga, tretirana kanalizaciona voda koja se ispušta u površinske vode može značajno pojačati koncentraciju virusa u životnoj sredini. Do virusne kontaminacije površinskih voda može doći i tokom obilnih padavina i ispuštanja otpadne vode sa životinjskih farmi i klanica (Lodder i de Roda Husman, 2005). Norovirusi su najčešći uzočnici infekcija koje se prenose vodom. Iako se ljudi najčešće inficiraju jednim sojem virusa, mnogi različiti sojevi se mogu naći u površinskim i kanalizacionim vodama (Skraber i sar, 2005).

Prisustvo NoV u površinskim vodama odražava da ovaj virus cirkuliše u populaciji ljudi. Norovirusi su najčešći izazivači epidemija virusima koji se prenose vodom. U Finskoj je NoV genogrupa II je u 86,9% bio uzrok svih epidemija, a u 7 od 20 epidemija uzrok je bio NoV GII.4 iz vode. Genotip GI.3 virusa, je jedan od najčešćih virusa odgovoran za epidemije izazvane ovim virusima u vodi. Za samo nekoliko godina ukupan broj genotipova NoV se uvećao na godišnjem nivou. Tokom poslednjih nekoliko godina GII.4, GII.b i GII.7, uzrokuju većinu epidemija, dok se drugi genotipovi ređe nalaze (Maunula, 2007). U Južnoafričkoj Republici, od 2008. do 2010. godine NoV su detektovani u 66% (70/106) uzoraka. Ispitani su uzorci vode iz tri reke i u 33% uzoraka je potvrđena genogrupa I, a u 38% GII. Ukazano je da ove reke mogu biti potencijalni izvor infekcije ljudi norovirusima ako koriste ovu vodu u domaćinstvima ili u rekreativne svrhe (Mans i sar, 2013). Mans i sar. su tri godine kasnije (2016), objavili rezultate o genotipovima NoV ispitanih od 2009. do 2013. godine u Južnoafričkoj Republici, kod hospitalizovane dece mlađe od 5 godina, sa simptomima gastroenteritisa. Genotipizacija NoV je izvršena na osnovu nukleotidne sekvence analizom RdRp i kapsid gena. Identifikovano je sedamnaest RdRp genotipova.

Norovirusi imaju veoma nisku infektivnu dozu, a po mnogim istraživanjima otporni su na hlorisanje u bazenima za rekreaciju. Podewils i sar. (2007) su istraživali visoku prevalencu norovirusa koja je povezana sa kontaminacijom bazena koji se koristi za rekreaciju, zbog mehaničkog kvara na opremi za dezinfekciju vode u bazenu. Takođe, mnoge studije su pokazale da se virusi ne mogu u potpunosti ukloniti tretmanima za prečišćavanje otpadnih voda (Laverick i sar, 2004; Gabrieli i sar, 2009). U severozapadnoj Francuskoj, tokom



decembra 2005. godine i od januara do marta 2006. godine, analizirani su uzorci iz četiri različita postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Norovirus GI je detektovan u oko jednoj polovini (43%), dok je NoV GII detektovan u većini (88%) uzoraka kanalizacione vode pre tretmana prečišćavanja. Norovirus GI bio prisutan u 24% uzoraka otpadne vode, a NoV GII u 14% ovih uzoraka. Koncentracija NoV GII na sva četiri lokaliteta je bila slična, što ukazuje na epidemiološku sličnost u populaciji ljudi, bez obzira na veličinu grada jer su svi lokaliteti međusobno bili udaljeni na oko 200km. Norovirus GI je detektovan neznatno češće u tretiranoj kanalizacionoj vodi, i razlika između GI i GII nije statistički značajna (da Silva i sar, 2007).

Krajem 2014. godine u jednoj školi na istoku Kine, 100 osoba je imalo dijareju i povraćanje. Epidemiološko ispitivanje je pokazalo da je voda za piće iz vodovodnog sistema kontaminirana norovirusima odgovorna za epidemiju. U uzorcima stolice obolelih, kao i u uzorcima vode su detektovani norovirusi GI.1, GI.2, GI.6, GII.4, GII.6 i GII.13. GII.4 sekvence u kliničkim uzorcima i uzorcima vode pokazali su veliku sličnost sa GII.4 sojem iz Sidneja 2012. godine. Rezultati u ovom istraživanju su ukazali da je voda za piće kontaminirana norovirusima i da je neophodno povećati nadzor nad sistemima za distribuciju vode za piće (Zhou i sar, 2015).

Kvantitativne metode predstavljaju pouzdanu procenu u određivanju prisustva virusa u vodi. U Velikoj Britaniji su analizirana 4 tipa vode: kanalizaciona voda pre i nakon tretmana prečišćavanja, morska i rečna voda. Klasičnom PCR metodom NoV je detektovan u 10 od 44 uzoraka kanalizacione vode pre prečišćavanja, dok je kvantitativnim PCR detektovan u 6 od 44 uzorka. U vodi nakon tretmana prečišćavanja NoV je detektovan 4 od 42 i 3 od 42 uzorka klasičnom i kvantitativnom metodom. U morskoj vodi je detektovan u 5, odnosno 4 od 36 uzoraka, dok je u rečnoj vodi detektovan u 4 i 3 od 25 uzoraka sa obe metode (Laverick i sar, 2004).

Iako su podzemne vode u odnosu na površinske mnogo zaštićenije od zagađenja, u mnogim zemljama su prijavljene epidemije izazvane virusima koje su u vezi sa podzemnim vodama. U Italiji se oko 80% pijaće vode dobija iz podzemnih izvora. Dvadeset i šest uzoraka vode je sakupljeno iz 12 izvora i 14 bunara. Svi uzorci su sakupljeni pre bilo kakvog tretmana, uključujući i hlorisanje. U uzorcima iz četiri bunara detektovani su NoV GI i GII (Gabrieli i sar, 2009).



U Koreji su podzemne vode jedini izvor pijaće vode u većini sela. Podzemna voda kontaminirana patogenima je potencijalni izvor izbijanja epidemija, naročito u slučaju nepravilno konstruisanih i loše održavanih bunara. U januaru 2008. godine u Koreji je prijavljena epidemija gastroenteritisa. Ustanovljeno je da je do epidemije došlo usled prisustva NoV GI u podzemnim vodama u akvaparku u kome je boravilo 180 učenika i nastavnika. U tri od šest uzoraka stolice kod pacijenata je detektovan norovirus (Koh i sar, 2011). U još jednom istraživanju u Koreji utvrđeno je prisustvo NoV u 14 od 160 uzoraka podzemnih voda u periodu od 2008. do 2010. godine (Lee i sar, 2012).

Kern (2014) godine je ispitala uzorke sa 41 lokacije u Mađarskoj: 13 bazena, 6 rečnih plaža, 2 sirove kanalizacione vode, 1 uzorak tretirane kanalizacione vode i 19 drugih površinskih voda. Od 129 površinskih voda u 51 je detektovan NoV GI, a u 52 uzorka je detektovan NoV GII. U jednom obimnom istraživanju na lokalitetima u 16 država ukupno je uzorkovano 1410 uzoraka vode. Norovirus je detektovan u 132 uzorka (9,4%), od čega je 49 (3,5%) bilo GI a 88 uzoraka je pripadalo GII (6,2%) (Wyn-Jones i sar, 2011).

Tokom nadzora norovirusa u Severnoj Italiji u trajanju od 5 godina, GII.4 soj je bio dominantan. Ukupno 435 (15,34%) od 2834 uzoraka stolice od dece mlađe od 14 godina, sa simptomima akutnog gastroenteritisa, je bilo pozitivno na norovirus. Od pozitivnih uzoraka norovirusa genogrupe II (99,2%), GII.P4 genotip preovlađuje (80%), pri čemu je u ovom istraživanju ovaj genotip prvi put otkriven u Italiji. Rezultati ove studije su ukazali da neophodan stalni nadzor i identifikacija novih sojeva (Medici i sar, 2014).

Zoonotsko prenošenje humanog NoV do sada nije dokazano. Detekcija ovih virusa kod životinja koje su u bliskom kontaktu sa inficiranim ljudima povećava sumnju zoonotskog prenosa i mogućnost da životinje budu rezervoari humanog NoV (Mathijs i sar, 2012).

2.5.1.3 Hepatitis A virus

Jedini do sada poznati rezervoar hepatitis A virusa je čovek. Prisustvo virusa u vodi ukazuje na postojanje epidemije u određenoj zajednici ljudi (Pond, 2005). Epidemije HAV su povezane sa njegovim prisustvom u površinskim vodama koje se koriste za piće i u rekreativne svrhe. Voda može biti izvor kontaminacije hrane, koja se navodnjava vodom u kojoj je prisutan HAV. Hepatitis A virus može da opstane do 14 dana na povrću kao što su dinje, zelena salata, paprika i drugo. Nekoliko publikacija je ukazalo na to da HAV može da



preživi i u rečnoj i morskoj vodi duži vremenski period (Craven i sar, 2009). Genotipovi i podvrste HAV pokazuju posebnu geografsku distribuciju. Širom sveta, naješći je genotip I, sa podtipovima IA koji je češći nego IB. U Kini i Tunisu više od 98% genotipa I pripadaju podtipu IA, dok u Turskoj 95% sojeva HAV pripada podtipu IB. Podtip IA cirkuliše u Južnoj i Severnoj Americi, Evropi, Aziji i Africi, a podtip IB dominira na Bliskom istoku i u Južnoafričkoj Republici. Ovaj podtip je prijavljen u 35% do 70% pacijenata inficiranih HAV na severozapadnoj Brazilu i gradu Rio de Ženeiro. Podtip IIA je čest u zapadnoj Africi. Genotip III ima globalnu distribuciju. Podtip IIIA je identifikovan u Aziji i Evropi, kao i u Madagaskaru i SAD. Nedavno je prijavljena infekcija HAV podtipa IIIA u Koreji, Rusiji i Estoniji (Vaughan i sar, 2014).

Svetska zdravstvena organizacija je procenila da se svake godine prijavi oko 1,4 miliona slučajeva hepatitisa A u svetu, sa različitim epidemiološkim i kliničkim znacima. Nekoliko studija je prijavilo detekciju hepatitisa A u otpadnim vodama, što ukazuje na fekalnu kontaminaciju površinskih voda. Hepatitis A je detektovan u sirovoj kanalizacionoj vodi u 33,4%, u tretiranim kanalizacionim vodama u 14,3% i u uzorcima recipijenta tretiranih otpadnih voda u 7,4%. Tokom 2013. godine u Italiji, svakog meseca su sakupljani uzorci i ukupno je ispitano 21 uzorak sirove kanalizacione vode, 21 uzorak tretirane kanalizacione vode i 27 površinskih voda. Hepatitis A virus je detektovan u 12 od 69 uzoraka i to u 7 od 21 uzoraka kanalizacione vode, 3 od 21 tretirane kanalizacione vode i 2 od 27 površinskih voda. Pet sekvenci je klasifikovano kao genotip IA, a preostalih 7 je pripadalo genotipu IB. U ovom istraživanju nije procenjena infektivnost virusa ali je napomenuto da detekcija HAV u površinskim vodama čak i malim koncentracijama može predstavljati značajan rizik po javno zdravlje zbog veoma niske infektivne doze i otpornosti u životnoj sredini (Iaconelli i sar, 2015).

Rezultati istraživanja Beji-Hamza i sar. (2014) u Tunisu su ukazali na cirkulaciju patogena u populaciji ljudi koja je bila najverovatnije asimptomatska infekcija. Ukupno su uzorkovali 150 uzoraka iz tretmana za prečišćavanje otpadnih voda od kojih je 79 uzoraka bila sirova kanalizaciona voda, a 71 tretirana kanalizaciona voda. Kvantitativnom analizom je potvrđeno prisustvo HAV u 68,3% uzoraka sirove kanalizacione vode 64,7% uzoraka tretirane otpadne vode. Većina HAV sekvenci pripadala je podgenotipu IA, i 11 detektovanih različitih sojeva su bili identični sa sojevima izolovanim kod pacijenata sa akutnim hepatitisom u Tunisu. Tokom 2013. godine u Geteborgu u Švedskoj testirani su



uzorci sakupljeni iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda „Ryaverket“. Detektovana su tri soja HAV, od kojih su dva bila povezana sa epidemijom HAV u Skandinaviji i koji su takođe identifikovani kod pacijenata sa akutnim hepatitisom A u Geteborgu tokom proleća 2013. godine. Treći soj nije otkriven kod pacijenata sa akutnim hepatitisom A (Hellmér i sar, 2014).

Hepatitis A virus može da kontaminira zemljište, useve i prirodne vodotokove izlivanjem kanalizacije. Shodno tome, hrana i voda se smatraju velikim prenosiocima HAV (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012). Hepatitis A virus je detektovan u izvorskim vodama, rekama, podzemnim vodama u Italiji, Tajlandu, Južnoafričkoj Republici i SAD. Infekcije ovim virusom su povezane sa upotrebom kontaminirane vode za piće, u rekreativne svrhe, za navodnjavanje (Craven i sar, 2009). Do kontaminacije vode kanizacionom vodom dolazi direktnim izlivanjem otpadne vode ili nakon tretmana kanizacione vode koji nije uvek adekvatan za uklanjanje virusa iz otpadnih voda (Jothikumar i sar, 2005). U uzorcima sirove i tretirane kanizacione vode u sistemu za prečišćavanje otpadnih voda u Rio de Ženeiru, HAV je detektovan u 24 od 25 uzoraka tretirane kanizacione vode. U ovoj studiji je dokazano da je nakon tretmana prečišćavanja brojnost koliformnih bakterija smanjena za 99,9%, a procenat za hepatitis A virus je bio 42%. Smatra se da je UV zračenje najprikladniji način za inaktivaciju i uklanjanje HAV u tretmanu otpadnih voda. Dokazano je da su sistemi za prečišćavanje vode koja se koristi u domaćinstvima sa aktivnim ugljem i UV zračenjem efikasno uklonili 99,9% enteričnih virusa (Craven i sar, 2009).

Na severoistoku Grčke od jula do novembra 2007. godine prijavljeno je 124 slučaja infekcije HAV u populaciji Roma. Hepatitis A sojevi istog genotipa su detektovani u svim serumima pacijenata sa akutnom bolešću. Sličnost je bila 99,8%, što ukazuje na zajednički izvor. Epidemija je pogodila uglavnom decu mlađu od 10 godina, i bila je povezana sa lošim sanitarnim uslovima (Vantarakis i sar, 2010).

Hepatitis A infekcije kod ljudi javljaju se kako usled kontaminirane vode, tako i hrane. Imajući u vidu izvore izloženosti i sve veću osetljivost kako dece tako i odraslih ljudi, nakon jednog istraživanja u koje je bio uključeno 13 evropskih zemalja, postojala je preporuka vakcinacije. Od januara 2013. do avgusta 2014. godine prijavljeno je ukupno 1.589 slučajeva infekcije hepatitis A virusom u ovim zemljama. Od ukupnog broja prijavljenih slučajeva 1.102 (70%) osobe su hospitalizovane u periodu od šest dana i prijavljene su dve smrti. Ispitivanjem je utvrđeno da je izvor infekcije bilo smrznuto bobičasto voće (Severi i



sar, 2015). Hepatitis A infekcija u Velikoj Britaniji javlja se sporadično. Vrhunac učestalosti je bio 1990. godine u Engleskoj i Velsu (7.545 slučajeva). U Škotskoj je primećeno stalno smanjenje akutne hepatitis A infekcije od 1993. godine do 2000. godine, kada je zabeležen najmanji ikad zabeležen broj slučajeva godišnje (50 slučajeva).

<https://www.gov.uk/government/publications/hepatitis-a-the-green-book-chapter-17>

Stopa infekcije hepatitis A virusom u svetu se smanjuje iz godine u godinu što je najverovatnije posledica poboljšanih uslova života (Iaconelli i sar, 2015).

2.5.2 Virusi životinja

Stočarstvo igra ključnu ulogu u globalnoj ekonomiji. Sa rastom svetske populacije raste i potreba za što većim razvojem poljoprivrede i stočarstva. Koriste se velike količine ograničenih resursa, kao što je sveža voda, što može dovesti do narušavanja ravnoteže u životnoj sredini (Atwill i sar, 2012). Odlaganje stajnjaka na tlo bez prethodnog tretmana ima veoma štetan uticaj na životnu sredinu. Zbog velike količine vode koja se troši u proizvodnji, mnoge studije su pokazale da je recikliranje vode nastale tretmanom otpadnih voda veoma korisno za poljoprivredu i proizvodnju svinja. Međutim, kako bi se osigurala bezbednost za ljude, životinje i životnu sredinu, neophodno je kontrolisati fizičke, hemijske i mikrobiološke parametre kvaliteta vode (Viancelli, 2012). Mnogi životinjski virusi mogu perzistirati u otpadnim vodama, naročito u otpadnim vodama iz klanica. Enterični virusi su najčešće prisutni u stajnjaku svinja. Mogu da se izlučuju u visokim koncentracijama u fekalijama životinja sa kliničkim znacima bolesti, ali su takođe prisutni u manjim koncentracijama u fekalijama i urinu zdravih životinja (Hundes, 2006; Viancelli, 2012).

2.5.2.1 Adenovirusi svinja

Adenovirusi svinja su predloženi za indikatore fekalne kontaminacije iako u većini slučajeva ne ispoljavaju kliničke simptome kod svinja (Bofill-Mas i sar, 2013). Adenovirusi svinja su rasprostranjeni širom sveta. Istraživanja u Engleskoj su pokazala da je PAdV tip 1 zastupljen manje od 1% u populaciji svinja, za razliku od PAdV tipa 4 koji je prijavljen u 66% uzoraka



seruma svinja. Tip 4 je detektovan u 15% uzoraka seruma svinja koje su imale znake respiratorne infekcije (Saif i Thiel, 1989).

Adenovirusi svinja su veoma rasprostranjeni u uzorcima životne sredine i fecesu svinja u Kataloniji (Španija). Od 206 izolata virusa u Španiji, 7 (3%) su identifikovani kao PAdV (Buitrago i sar, 2010). U gradu Concordia u južnom delu Brazila je utvrđeno da je PAdV bio prisutan u 30% uzoraka vode za piće što ukazuje da otpad sa stajnjaka ugrožava kvalitet vode za piće i ukazuje na potencijalni rizik za javno zdravlje (Garcia i sar, 2012). Takodje u Brazilu, od 56 uzoraka vode poreklom od dva sistema za tretman stajnjaka u 66% i 78% uzoraka je detektovan PAdV (Viancelli i sar, 2012).

Ispitivanjem uzoraka otpadnih voda iz klanice u Španiji, u svih deset testiranih uzoraka je utvrđeno prisustvo PAdV. U istom istraživanju, sedam od devet uzoraka reke Ter u Španiji su bili pozitivni na PAdV. Tačke uzorkovanja su izabrane u blizini farmi (Hundesda i sar, 2006). U sličnom istraživanju, devetnaest od 21 uzorak fecesa svinja sa farmi u Španiji je bilo pozitivno na PAdV. Analizom uzoraka iz reke Ter je potvrđeno prisustvo fekalne kontaminacije jer je detektovan PAdV. Uzorci urbane kanalizacione vode su svi bili negativni na PAdV ali je to i bilo očekivano jer u blizini naseljenog mesta nisu prijavljene farme (Hundesda i sar, 2009). Takođe u Španiji, analizirano je 5 pulovanih uzoraka fecesa sa dve farme i 3 uzorka su bila pozitivna u obe farme na PAdV. Svih 12 uzoraka gradske kanalizacione vode u Barseloni, uzorkovane svaki mesec od avgusta 2000. do jula 2001. godine su bili pozitivni na PAdV (Maluquer de Motes i sar, 2004). Rezultati istraživanja Bofill-Mas i sar. (2013) su pokazala da PAdV je detektovan u uzorcima otpadnih voda iz klanica, rečnih voda kontaminiranih fecesom sa farmi, što je i bilo očekivano, za razliku od uzoraka gradske kanalizacije. Kern (2014) je ispitala uzorke sa 41 lokacije u Mađarskoj: 13 bazena, 6 rečnih plaža, 2 sirove kanalizacione vode, 1 uzorak tretirane kanalizacione vode i 19 drugih površinskih voda. U ukupno 129 površinskih voda PAdV je detektovan u 106.

2.5.2.2 Poliomavirus goveda

Široka rasprostranjenost infekcije poliomavirusa goveda (*Bos Taurus polyomavirus 1*; Bovine polyomavirus; BPyV) i visoka stopa izlučivanja na farmama su omogućila da BPyV može biti veoma važan parametar u praćenju fekalne kontaminacije u životnoj sredini. Poliomavirus goveda je prvobitno izolovan na kulturama ćelija, a sekvenca je prvi put



prijavljena u GenBank 1990. godine. Antitela su otkrivena kod goveda i kod ljudi koji su bili u bliskom kontaktu sa inficiranim životinjama (Hundesa i sar, 2006).

Od maja do jula 2004. godine u Kataloniji u Španiji testirano je 22 uzorka otpadnih voda iz klanica, 9 uzoraka gradske kanalizacione vode na ulazu u postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda i 9 uzoraka iz 2 reke potencijalno pogođene fekalnim životinjskim zagađenjem. Poliomavirus goveda je detektovan u 21 od 22 uzorka otpadnih voda iz klanice što ukazuje da je BPyV bolji indikator za praćenje fekalne kontaminacije od adenovirusa goveda (BAdV). Četiri uzorka iz Reke Ter i jedan uzorak iz reke Llobregat su bili pozitivni na prisustvo BPyV, a tačke uzorkovanja su izabrane u blizini farmi. Niti u jednom od 9 uzoraka gradske kanalizacione vode nije detektovan BPyV. Ovo istraživanje je bila prva detekcija ovog virusa koji je nadjen u 95% analiziranih uzoraka, nakon 1990. godine kada je prijavljena kompletna sekvenca BPyV (Hundesa i sar, 2006).

Tokom 2008. godine u različitim oblastima Katalonije sakupljeno je 26 uzoraka urina sa tri farme goveda, 11 uzoraka otpadnih voda iz klanica, 8 uzoraka gradske kanalizacione vode na ulasku u postrojenje za prečišćavanje otpadnih voda u Barseloni i 6 uzoraka iz reke Ter koji su uzeti nizvodno od farmi goveda i svinja. U osam od 26 (30,8%) uzoraka urina goveda je detektovan BPyV. Svi uzorci iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda gradske kanalizacije su bili negativni na prisustvo BPyV što je i bilo očekivano jer nije prijavljena niti jedna farma koja bi otpadne vode izlivala u gradsku kanalizaciju. Od jedanaest uzoraka otpadnih voda iz klanica u skoro svim uzorcima (90,9%) je detektovan BPyV. U uzorcima iz reke Ter otkriveno je prisustvo BPyV u tri od šest uzoraka. Primenljivost BPyV kao indikatora fekalne kontaminacije poreklom od goveda je bila pod znakom pitanja zbog slabe osetljivosti molekularnih metoda za detekciju virusa, visoke genetske varijabilnosti virusa ali i njegove niske prevalencije. Međutim, u tom istraživanju sekvenciranjem je dokazano da je sekvenca pokazala sličnost u više od 98% iz uzoraka urina, što je utvrđeno i u prethodnom istraživanju sekvenci dobijenih od uzoraka otpadnih voda iz klanica, i više od 94% sa sekvencama iz drugih izvora dostupnih u GenBank. Stoga, postoji jasna prednost za korišćenje BPyV kao indikatora fekalnog zagađenja u životnoj sredini u odnosu na BAdV. Studije drugih autora su pokazale da su antitela BPyV bila prisutna u 60% uzoraka seruma goveda. BPyV je široko geografski rasprostranjen i obično ne dovodi do teške kliničke slike. S obzirom da goveda izlučuju velike količine urina, kvantitativni podaci u ovom istraživanju ukazuju da se značajna koncentracija BPyV izlučuje u životnu sredinu (Hundesa i sar, 2010).



Rezultati istraživanja Bofill-Mas i sar. (2013) su pokazala da BPyV je detektovan u uzorcima otpadnih voda iz klanica, rečnih voda kontaminiranih fecesom sa farmi, što je i bilo očekivano, za razliku od uzoraka gradske kanalizacije. Kern (2014) je ispitala uzorke sa 41 lokacije u Mađarskoj, kao što je navedeno u prethodnom poglavlju, i u 129 površinskih voda u 101 je detektovan BPyV.

2.5.3 Zoonotski virusi

Zoonoze, od grčkog „zoon“ (životinja) i „nosos“ (bolest), su infekcije koje se prenose sa životinja (domaćih i divljih) do čoveka i od čoveka do životinje, na nekoliko različitih načina: direktnim kontaktom, putem vektora (komarci i krpelji) ili preko hrane i vode. Virusni su važni etiološki agensi u nastajanju ili ponovnom pojavljivanju zoonoza (Santos i Monteiro, 2013). Izlaganje čoveka zoonozama ima dva glavna epidemiološka obrasca. U prvom slučaju postoji jasan izvor i tačka izloženosti čoveka zoonoznom agensu, a zatim se bolest se prenosi među ljudima. U drugom slučaju, životinje služe kao rezervoar i infekcija se prenosi na ljude ali u malom broju slučajeva se prenosi između ljudi (Bolin i sar, 2004).

Stočarstvo generiše značajnu količinu otpada koji može dovesti do zagađenja vodotokova, ako se njime nepropisno upravlja. Pored toga, ovaj otpad je izvor zoonoznih patogena (Atwill i sar, 2012). Kontaminirana voda, školjke, kontaminirano meso životinja i kontakt sa zaraženim životinjama su izvor epidemija hepatitis E virusa (D'Agostino, 2013). Prema EFSA (2011) prenošenje hepatitis E virusa sa životinja na ljude može doći nakon konzumiranja sirovih ili nedovoljno termički obrađenih proizvoda životinjskog porekla.

2.5.3.1 Hepatitis E virus

Domaće i divlje svinje se smatraju rezervoarima hepatitisa E. Infekcija hepatitis E virusom ali i oboljenje pojavljuju se praktično svuda, ali učestalost oboljenja zavisi od regiona (Emerson i Purcell, 2004). Prvi rezultati izolacije i detekcije HEV direktno iz uzoraka životne sredine su publikovani 1993. godine, a ispitivani su uzorci iz grada Madras u Indiji. Hepatitis E virus je utvrđen u uzorcima sirove kanalizacione vode i vode nakon tretmana prečišćavanja. Ranije studije o detekciji HEV su bile ograničene na kliničke uzorke i nisu



postojali komercijalni kitovi za detekciju HEV (Jothikumar i sar, 1993). Tokom decembra 1993. godine i u prva tri meseca 1994. godine u Pakistanu je bila velika epidemija HEV gde je 10,4% stanovnika imalo akutni ikterični hepatitis (Rab i sar, 1997).

U naselju Gokulpuri u Delhiju u periodu od januara 2000. do marta 2003. godine u Centru za javno zdravlje prijavljen je 141 slučaj hepatitisa E kod ljudi. Sakupljen je 141 uzorak kanalizacione vode i vode za piće. U šest od 141 uzorka kanalizacione vode i 2 od isto toliko uzoraka vode za piće je detektovan hepatitis E virus što ukazuje na fekalnu kontaminaciju vode za piće i potvrđuje fekalno-oralni put prenošenja virusa (Hazam i sar, 2010).

Hepatitis E virus se sporadično javlja u Sevenoj Africi i Srednjem Istoku. U avgustu 2004. godine je prijavljeno preko 4000 slučajeva sumnje na HEV u Sudanu i nekoliko stotina u Iraku. Razlozi koji su doveli do toga su nehigijenski uslovi, neadekvatan tretman otpadnih voda, problemi u snabdevanju sa pijaćom vodom i brojni drugi (Emerson i Purcell, 2004). Trudnice sa HEV mogu imati povećan rizik za krvarenjem zbog nedostatka faktora koagulacije. Rano otkrivanje prisustva virusa može biti od pomoći u lečenju (WHO, 2014).

U Pakistanu je 2010. godine od ukupno 86 uzoraka kanalizacione vode u 35 detektovan HEV. Autori smatraju da su ovi rezultati posledica toga što je Pakistan zemlja u razvoju sa niskim zdravstvenim i obrazovnim standardom, bez odgovarajućih higijenskih uslova i kvalitetne vode za piće jer u većini slučajeva dolazi do mešanja vode za piće sa kanalizacionom vodom (Ahmad i sar, 2010). U siromašnim zemljama detekcija HEV u vodi ukazuje na fekalnu kontaminaciju vode (Hazam i sar, 2015).

Istraživanja su radjena u Cirihi u Švajcarskoj, tokom 2011. i 2012. godine, kada je HEV detektovan u 40 uzoraka sirove kanalizacione vode od ukupno 124. Hepatitis E virus je detektovan u 31 uzorak sakupljen tokom leta i 9 tokom zime, gde se vidi da je učestalost pojave HEV tokom leta znatno veća. Ovaj sezonski karakter zahteva dalja istraživanja jer do sada nije bio opisan u drugim studijama. Niti u jednom uzorku sakupljenom nakon prečišćavanja kanalizacije nije detektovan HEV. S obzirom da u Cirihi nije dozvoljeno farmama da ispuštaju otpadne vode u kanalizaciju moguće da je izvor detekcije HEV poreklom od ljudi (Masclaux i sar, 2013).

Prema saznanjima Iaconelli i sar. (2015), u rečnim vodama u Italiji HEV je prvi put otkriven 2015. godine. Od ukupno 21 uzorak sirove kanalizacione vode, 21 uzorak tretirane i 27 uzoraka površinske vode, HEV je detektovan samo u 2 uzorka (sirova kanalizaciona voda i površinska voda). Oba uzorka su sakupljena u martu 2013. godine i pripadaju genotipu III.



Autori nisu mogli sa sigurnošću da procene šta je bio izvor HEV otkrivenog u ovim uzorcima jer se otpadne vode sa farmi ne izlivaju u površinske vode, ali smatraju da je jedan od mogućih izvora oticanje vode sa farme i spiranje kroz zemljište netretiranog svinjskog đubriva poreklom sa farme.

Većina prijavljenih epidemija je nakon jakih kiša i poplava kada dolazi do kontaminacije bunarske vode, vode za piće i velike količine neprečišćene otpadne vode koja dospeva u tretmane za prečišćavanje. Epidemije HEV koje su u vezi sa hranom su uglavnom nakon konzumiranja sirovih i nekuvanih školjki. Prijavljeni su sporadični slučajevi epidemije u Španiji gde se školjke gaje u oblastima zagađenim otpadnim kanalizacionim vodama (Hazam i sar, 2015).

Nekoliko studija je potvrdilo da se HEV prenosi preko lanca ishrane (Prpic i sar, 2015). U Španiji Pina i sar. (2000) utvrdili su sličnost među sojevima HEV detektovanih u otpadnim vodama klanice i kod ljudi koji su imali akutni hepatitis. Rezultati ispitivanja HEV u Hrvatskoj su potvrdila da je genotip III HEV prisutan u populaciji domaćih i divljih svinja i da može predstavljati značajan rizik za zdravlje ljudi. Visoka prevalenca ovog virusa je potvrđena i u mnogim drugim evropskim zemljama (Rutjes i sar, 2007; Reuter i sar, 2009; Prpic i sar, 2015). U Holandiji se prevalenca virusa povećala sa 22% na 55% od 1999. do 2005. godine što je izazvalo zabrinutost zbog potencijalnog zoonoznog prenošenja virusa ili putem eventualno kontaminirane vode ili konzumiranja kontaminiranog svinjskog mesa. Jedan od otkrivenih sojeva u Holandiji pripadao je evropskom tipu, koji do tada nije bio prisutan, što je potvrdilo da se HEV širi na području Evrope (Rutjes i sar, 2007).

Istraživanje Ivanova i sar. (2015) u Estoniji je pokazalo da su domaće i divlje svinje mogući izvori za infekcije ljudi hepatitis E virusom. Od 449 uzoraka fecesa svinja 103 (22,9 %) su bili HEV RNK pozitivni u svih devet ispitanih farmi. Od ukupno 67 uzoraka seruma radnika na farmama 9 (13,4 %) je bilo pozitivno na anti - HEV IgG, a četvero od njih su bili pozitivni na anti - HEV IgM. Od 471 uzorak mesnog soka poreklom iz mesa divljih svinja 81 (17,2%) su bili pozitivni na anti - HEV antitela. Hepatitis E virus je detektovan kod divljih svinja u svih 14 ispitanih lovišta. Kod seropozitivnih uzorka, metoda Lančane reakcije polimeraze je pokazala prisustvo HEV RNK u 13 (16%) uzoraka. Od 144 uzorka seruma lovaca, šest (4,2%) su bili seropozitivni na anti - HEV IgG. Jedan od njih je imao detektabilni nivo IgM (Ivanova i sar, 2015). Bezbednost hrane jeste veoma značajan aspekt u epidemiologiji hepatitis E virusa. Ovaj virus može biti inaktivisan uobičajenim postupcima termičke obrade, mada



temperatura od 56°C u toku jednog časa ne može da inaktivira virus. Dodatni pokazatelj zoonotskog potencijala virusa jeste nalaz antitela na virus hepatitisa E u brojnim studijama, kod farmera i veterinara koji rade na farmama svinja, a pri tome ne pokazuju kliničke znake oboljenja (Kureljušić i sar, 2012).

2.6 UTVRĐIVANJE PRISUSTVA VIRUSA U VODI

Osnovni koraci pri virusološkoj analizi kvaliteta vode su uzorkovanje, koncentracija i detekcija virusa (Barkely i Prescott, 2008). Za detekciju virusa u uzorcima životne sredine najčešće se koriste metode kulture ćelija i molekularne metode (Bosch, 1998; Lodder i sar, 2010). Pre detekcije virusa u vodi neophodno je koncentrisati viruse u uzorku vode. Cilj koncentrisanja virusa je da se prikupi što više virusa u uzorku minimalne zapremine (Cliver, 2008). Ova količina uzorka se zatim može koristiti za utvrđivanje prisustva virusa molekularnim, imunološkim ili metodama izolacije virusa na kulturi ćelija. Svi protokoli za koncentrovanje virusa u uzorcima vode se uglavnom baziraju na sledećim koracima: adsorpcija virusa na filter, elucija virusa pomoću pufera bogatog proteinima, flokulacija virusnih partikula sa proteinima, koncentrovanje centrifugiranjem, nakon čega sledi resuspendovanje virusa iz taloga dobijenog centrifugiranjem i filtracija radi otklanjanja krupnih partikula, a zatim ekstrakcija virusa, na primer sa hloroformom (Crocini i sar, 2008; Rodriguez-Lazaro i sar, 2012).

Metoda koncentrisanja virusa iz vode je razvijena 1940. godine. Metoda je bila veoma jednostavna ali nisu postojali konkretni podaci o količini vode koja je neophodna za analize. Wallis i Melnic (1967) su razvili metodu koncentrisanja virusa iz vode pomoću negativno naelektrisane membrane. Virusi se adsorbuju na negativno naelektrisanu membranu, uz dodatak Mg^{2+} jona a zatim eluiraju (odvajaju) sa „goveđim ekstraktom“ (beef extract) (pH 9,5). Sobsey i sar. (1973) su modifikovali ovu metodu koristeći kiselinu umesto Mg^{2+} jona, a 1979. godine Sobsey i Jones (1979) su razvili metodu pozitivno naelektrisane membrane kod koje se virusi adsorbuju na pozitivno naelektrisanu membranu bez dodavanja Mg^{2+} jona ili kiseline. Virusi se eluiraju rastvorom goveđeg ekstrakta, a metoda ne podrazumeva posebnu pripremu uzorka vode. Novu metodu koncentrisanja virusa u kiselim i baznim uslovima razvili su Katayama i sar. (2002). Ukratko, uzorak vode se filtrira, ispirira sa H_2SO_4 ,



eluiraju sa NaOH, a zatim, nakon neutralisanja u koloni, centrifugira. Ovu metodu su modifikovali Haramoto i sar. (2004). Membrana je pozitivno naelektrisana sa $AlCl_3^+$ što je omogućavalo adsorpciju virusa bez dodavanja Mg. Ukratko, uzorci vode se filtriraju kroz membranu, a zatim eluiraju sa goveđim ekstraktom i nakon centrifugiranja talog se resuspenduje u PBS za RNA ekstrakciju (Bosch i sar, 2011). Nivo enterovirusa u životnoj sredini često je veoma nizak i u nekim slučajevima je potrebno da se koncentriše i do 1000 L vode pre upotrebe metode detekcije molekularnim metodama ili na kulturama ćelija (Fong i Lipp, 2005). Metoda adsorpcije - elucije na staklenoj vuni je dokazano veoma jednostavna, ekonomična i veoma uspešno se upotrebljava za rutinski virusološki nadzor, a naročito u uzorcima vode većeg volumena (Bosch i sar, 2011). Uspešnost koncentrisanja virusa iz uzoraka površinskih i otpadnih voda se procenjuje na osnovu podataka o *Recovery* vrednosti (procenat prinosa) virusa. *Recovery* vrednost predstavlja % virusnih čestica dobijen nakon postupaka koncentrisanja vode i ekstrakcije nukleinskih kiselina u odnosu na ukupan broj virusnih čestica koji je bio u uzorku. Brojne studije su potvrdile da je za dobar *Recovery* virusa najpogodnija metoda elucije virusa sa organskim rastvorima (npr. goveđi ekstrakt). Goveđi ekstrakt se u mnogim istraživanjima pokazao kao veoma delotvorno rešenje za eluciju virusa sa filtera. Obzirom da inhibitorni faktori u uzorcima iz životne sredine mogu predstavljati problem za molekularne metode detekcije, bilo je neophodno razviti metode re-koncentracije eluata. U početku se smatralo da re-koncentracija eluata, kojom bi se uklonili organski inhibitori, može dovesti do većeg gubitka virusa, ali su do danas razvijena alternativna rešenja elucije i koncentrovanja virusa u što manjem volumenu uzorka, koja ne predstavljaju problem gubitka virusa iz eluata (Dahling i Wright, 1986; Ikner i sar, 2012; Lambertini i sar, 2008).

Za detekciju humanih enteričnih virusa se mogu koristiti različiti pristupi: direktan – elektronska mikroskopija i pojava citopatogenog efekta (CPE) na ćelijskim kulturama tokom izolacije virusa i indirektan – imunološke i molekularne metode. Direktna elektronska mikroskopija je težak, dugotrajan, subjektivan proces i ograničene osetljivosti, a viruse često nije moguće morfološki diferencirati u određene sistemske kategorije jer su veoma slični međusobno, pa ih nije moguće razlikovati, osim ako nemaju neku specifičnost (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012). Metoda izolacije virusa na kulturama ćelija za detekciju patogenih virusa nije praktična za rutinski monitoring jer zahteva više dana, čak i nedelja za dobijanje rezultata. Takođe, neke viruse nije moguće umnožavati na kulturama ćelija



(Barkely i Prescott, 2008). Koncentrisani uzorci vode se inokulišu na kulture ćelija specifične za određeni tip virusa. Glavni nedostatak izolacije virusa na kulturama ćelija, pored drugog trajanja analize je i potreba za nekoliko pasaža, kako bi se potvrdio pozitivan ili negativan rezultat. Pored toga, često su koncentrisani uzorci voda citotoksični za kulturu ćelija i time onemogućavaju detekciju virusa. Mnogi virusi ne izazivaju CPE, izuzetno sporo rastu ili uopšte ne rastu na ćelijskim kulturama. Na primer, adenovirusi, koji su jedan od najvažnijih ljudskih patogena i često otkriveni u većem broju od enterovirusa u otpadnim vodama, veoma sporo rastu, i često ne dovode do CPE. Takođe, norovirusi ne mogu da rastu na ćelijskim kulturama. Za ove viruse su metode lančane reakcije polimeraze („Polymerase chain reaction“ – PCR) verovatno jedini način za detekciju. Metoda lančane reakcije polimeraze je brza, osetljiva i specifična metoda. Može da detektuje veoma mali broj čestica virusa iz životne sredine, koji verovatno ne bi izazvali CPE na kulturama ćelija (Fong i Lipp, 2005).

Još jedna od metoda za detekciju virusa je kvantitavno određivanje detekcijom plakova na kulturi ćelija. Neki virusi ne formiraju plakove, međutim, neki virusi imaju visoku efikasnost formiranja plakova (Hill i sar, 1971). Test imunofluorescencije (IFA) koristi se često za detekciju virusa u kliničkim uzorcima. Utvrđeno je da je IFA osetljivija i brža od metode formiranja i detekcije plakova za detekciju rotavirusa, prilikom izolacije na kulturi ćelija. Pokazalo se da je 10 infektivnih čestica po litri moguće pouzdano detektovati za manje od 24 h inkubacije na kulturi ćelija (Hamza i sar, 2011).

S obzirom da se neki virusi veoma teško razmnožavaju na kulturama ćelija ili ih je nemoguće umnožavati, molekularne metode su veoma korisne za detekciju virusa (Bosch, 1998; Lodder i sar, 2010). Mnoge studije koriste kombinaciju kulture ćelija i molekularnih metoda za utvrđivanje infektivnosti virusa. U manjem obimu koristi se imunoenzimska metoda - ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), s obzirom da je njihova analitička osetljivost još uvek suviše niska za efikasno testiranje uzoraka životne sredine. U praksi se najčešće koriste molekularne dijagnostičke metode (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012).

Amplifikacija sekvenci nukleinskih kiselina – NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) je tehnika koja je prvi put opisana 1991. godine (Compton, 1991). Koristi se za kontinuiranu amplifikaciju nukleinskih kiselina pri izotermalnim uslovima. U ovoj reakciji se koriste tri različita enzima za amplifikaciju sekvenci jednolančanog RNK molekula (T7 RNK polimeraza, RNK-aza i reverzna transkriptaza virusa ptičijeg mijeloblastoma – AMV)



(Rodriguez-Lazaro i sar, 2006). Reakcija uključuje i dva oligonukleotidna prajmera koji su komplementarni ciljnom regionu RNK molekula, dezoksiribonukleotidne trifosfate za aktivnost AMV reverzne transkriptaze i ribonukleozidne trifosfate za aktivnost T7 RNK polimeraze. Reakcija se odvija na temperaturi od 41°C u trajanju od 1-2h. Na ovoj temperaturi genomska DNK ostaje dvolančana i tako ne može postati substrat za amplifikaciju (Stjepanovic i sar, 2007). Ova metoda se često koristi za detekciju virusa u hrani. Kombinacija metode izolacije virusa na kulturama ćelija i naknadne detekcije molekularnim biološkim metodama omogućava smanjenje inkubacionog perioda a takođe i detekciju virusa koji nisu izazvali citopatogeni efekat (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012).

Prethodno razmatrane tehnike za detekciju virusa najčešće se koriste u medicinskoj dijagnostici, ali su manje popularne za analizu uzoraka površinske i kanalizacione vode. Razlog tome je što postoje brojni nedostaci. Do sada još uvek nisu date smernice i razrađene metode koje bi bile najadekvatnije za ispitivanje virusa u uzorcima iz životne sredine (Hrynyszyn i sar, 2013).

Od većeg broja molekularnih metoda, naročito su u upotrebi klasične ili gel-bazirane PCR tehnike (PCR, RT-PCR i nested PCR), kao i real-time PCR (qPCR) i real-time RT-PCR (RT-qPCR) tehnike. Lančanu reakciju polimeraze (PCR) je 1983. godine otkrio Kary Mullis, a već 1985. godine je objavljena prva primena u dijagnostičke svrhe u ispitivanju srpaste anemije kod ljudi (Saiki i sar. 1985). Sa otkrićem termostabilne DNK polimeraze (Saiki i sar, 1988), metoda je dobijala sve veći značaj u dijagnostici infektivnih oboljenja.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je „in vitro“ metoda prajmerom dirigovanog umnožavanja kratke specifične DNK sekvence. Ovom metodom se deo nukleinske kiseline patogena u uzorku može specifično umnožiti do 2^n (n -broj ciklusa) kopija. Kada je polazni materijal RNK patogena, neophodan prethodni korak predstavlja reverznu transkripciju (RT) u svrhu dobijanja jednolančane komplementarne DNK (cDNK) koja ulazi u PCR reakciju. Metoda lančane reakcije polimeraze je bazirana na enzimatskom umnožavanju dela virusnog genoma upotrebom termostabilne DNK polimeraze korišćenjem specifičnih oligonukleotidnih prajmera. Reakcija se sastoji od većeg broja ponovljenih ciklusa promena temperature u kojima dolazi do umnožavanja specifičnog fragmenta DNK. Svaki ciklus se sastoji od tri dela: razdvajanje lanaca DNK (eng. *denaturation*) na oko 95°C, vezivanje početnih oligonukleotida – prajmera (eng. *primer annealing*) na tačno određeno, komplementarno mesto na lancu DNK, pri temperaturi od 45 do 72°C i sinteza (eng. *primer*



extension) ili izduživanje vezanih prajmera u pravcu formiranja novog komplementarnog dela DNK lanca, koji se odvija većinom pri temperaturi od 72°C. Nakon odgovarajućeg broja ciklusa sledi finalna ekstenzija u trajanju 5-15 min. na temperaturi 72°C, čime se broj kopija dodatno povećava. Celokupna reakcija se odvija u „thermocycler“ koji omogućava programiranje temperaturnog režima i vremena ciklusa i njegovih delova. Reakcija se najčešće sastoji od 25 do 40 ciklusa. Ponovljenim ciklusima denaturacije, vezivanja i sinteze moguće je umnožiti specifičan deo DNK tačno određene veličine, čiji se veliki broj kopija akumulira u mikrogramskim količinama koje lako mogu da se vide u gelu posle bojenja etidijum - bromidom kod klasičnih PCR i RT-PCR reakcija, odnosno intenzitetom emisije fluorescentnog zračenja kod real-time PCR i RT-PCR reakcija. (Saiki i sar, 1985; Saiki i sar, 1988; Boye i sar, 1991; Petrovic i sar, 2006, 2010b). Lančana reakcija polimeraze (PCR) je veoma bitna metoda za epidemiološke studije jer omogućava diferencijaciju genotipova virusa koristeći specifične prajmere (Barkely i Prescott, 2008). Rezultati nakon PCR metode mogu se dobiti za nekoliko sati od vremena uzorkovanja (Fong i Lipp, 2005). Greening i sar. (2002) su upoređivali tri metode (izolacija virusa na kulturi ćelija, izolacija na kulturi ćelija sa PCR i PCR) za detekciju virusa u uzorcima životne sredine i utvrdili da je direktan PCR najuspešnija metoda, jer je detektovan najveći procenat adenovirusa i enterovirusa ovom metodom.

Dalji razvoj PCR je uslovio pojavu novih molekularnih tehnika. Molekularne metode real-time PCR (qPCR) odnosno real-time RT-PCR (RT-qPCR) (PCR i RT-PCR u stvarnom vremenu), predstavljaju bržu, osetljiviju (i do 100 puta), specifičniju, manje zdravstveno opasnu i ekološki čistiju (ne koriste se kancerogena sredstva u radu) a sofisticiraniju tehniku u odnosu na konvencionalne gel bazirane metode PCR i RT-PCR. Ovim metodama je moguće pratiti signal umnožavanja dela genoma infektivnog agensa u svakom momentu reakcije, kao i tačno kvantifikovati (uporednim korišćenjem standarda) količinu infektivnog agensa u startnom materijalu, pri čemu je istovremeno smanjena mogućnost unakrsne kontaminacije i dobijanja lažno pozitivnih rezultata, a omogućeno je istovremeno ispitivanje velikog broja uzoraka.

Real-time PCR je nov, savremen test koji je, za razliku od klasičnog PCR, u mogućnosti da stvaranje i nakupljanje specifičnog produkta prati kroz vremensku dimenziju i samim tim se početna količina ciljnog dela DNK ili RNK u uzorku može lako izračunati. Postoji više vrsta real-time PCR reakcija. Najčešće je u upotrebi "TaqMan" test koji koristi fluorescentnu



emisiju kao meru za akumulaciju specifičnog PCR produkta. Kod ove reakcije se pored prajmera koristi i specifična proba koja se dizajnira tako da je korespondentna tj. specifična jednom delu DNK koji se umnožava prajmerima. Proba na jednom kraju (5') ima vezan emiter signala energije, a na drugom kraju (3') absorber energije (tzv. kvenčer). Samo kada se prajmeri vežu i umnože specifičan produkt DNK koji se detektuje, u toku umnožavanja vezaće se i proba za specifičan produkt. Pri tome dolazi do izduživanja probe i cepanja veze emitera i apsorbira putem enzimske aktivnosti Taq polimeraze što se očitava emisijom fluorescencije koju registruje real-time PCR aparat. Što je intenzivnija emisija veći je broj vezanih proba, odnosno više je produkta reakcije. Na ovaj način se kvantitativno može odrediti povećanje specifičnog produkta u vremenu. Detekcija podrazumeva detekciju fluorescencije, emitovane od strane fluorescentne probe, koja se koristi kao sistem za detekciju. Prag (eng. Threshold) je vrednost koja se zadaje real-time PCR aparatu, kao nivo fluorescencije koji predstavlja prag detekcije koji treba da detektuje za pojedinačan uzorak (uvek se postavlja u eksponencijalnoj fazi). Uzorci se međusobno razlikuju po broju ciklusa amplifikacije koji im je potreban da dostignu zadatu vrednost praga detekcije, a to je takozvana Ct vrednost (što je veća početna količina ciljnog dela DNK u uzorku, to mu je potrebno manje ciklusa da dostigne zadati prag detakcije tj. manja je Ct vrednost za taj uzorak).

Glavna poteškoća prilikom analize uzoraka životne sredine metodom qPCR je prisustvo supstanci koje inhibiraju PCR reakciju. Za ekstrakciju DNK, iz ovog razloga, najčešće se koristi metoda sa magnetnim česticama i često nema potrebe razblaživati uzorak, osim u slučaju uzoraka voda teško opterećenih organskim i neorganskim materijama (kao što je kanalizaciona voda). Uopšteno, preporučuje se da se uzorci iz životne sredine testiraju i koncentrovani i u desetstrukom razblaženju ekstrahovanih nukleinskih kiselina u cilju smanjenja uticaja inhibicije reakcije, dobijanja pozitivnih rezultata i preciznije kvantifikacije (Hundesda i sar, 2009).

Mnoge studije su pokazale da je osetljivost qPCR najčešće značajno veća nego kod PCR (Fong i Lipp, 2005). Staggemeier i sar. (2015) su upoređivali metode klasičan PCR i qPCR za detekciju humanih adenovirusa u uzorcima površinskih voda i sedimenta. Autori su potvrdili da su klasičan PCR i njegove varijante veoma osetljivi i specifični, ali imaju neka ograničenja, kao što su: korišćenje agarozna ili poliakrilamid gel elektroforeze, rizik od kontaminacije, nemogućnosti kvantifikacije amplifikacije, i korišćenje reagenasa poput



etidijum-bromida koji je kancerogen. U odnosu na klasičan PCR, za detekciju HAdV u uzorcima iz životne sredine, qPCR se pokazao se kao pouzdana i ekonomična metoda. Osim toga, amplifikacija i detekcija se vrše u zatvorenom sistemu, čime je smanjena mogućnost kontaminacije.

Sekvenciranje DNK je tehnika kojom se određuje tačan redosled nukleotida nukleinskih kiselina. Prva dva opšte poznata postupka za utvrđivanje redosleda nukleotida DNK su se pojavila 1977. godine. U pitanju su *Chemical cleavage ili Maxam-Gilbert-ov metod* i *Chain terminator, Dideoxy ili Sanger sekvenciranje*. Oba pristupa određivanja sekvence nukleinske kiseline se oslanjaju na odvajanje smeše fragmenata različitih veličina na poliakrilamidnom gelu.

Prvi metod koji su opisali Sanger i Coulson 1975. godine za sekvenciranje DNK zvao se „plus i minus“ ali zbog neefikasnosti ove metode, dve godine kasnije, Sanger i njegovi saradnici su opisali novu revolucionarnu metodu za sekvenciranje oligonukleotida enzimskom polimerizacijom (Sanger i sar, 1977; Franca i sar, 2002). Ova metoda je podrazumevala enzimsku reakciju DNK polimeraze koja formira nov komplementaran lanac koristeći dideoxi nukleotide. Metoda je izvedena u četiri različite tube, od kojih svaka sadrži odgovarajuću količinu jednog od četiri terminatora (A,T,G,C). Svi generisani fragmenti su imali isti 5' kraj, a ostatak na 3' kraju je određen dideoksinukleotidima koji se koriste u reakciji. Kada se završe sve četiri reakcije, dobija se smeša različitih veličina DNK fragmenata. Postupak sekvenciranja na osnovu hemijske degradacije su opisali Maxam i Gilbert 1977. godine. Ova metoda podrazumeva nasumično cepanje lanca DNK na 4 različita nukleotida (adenin, guanin, citozin i timin), koristeći specifične hemijske agense. Proizvodi ove četiri reakcije se razdvajaju elektroforezom na poliakrilamidnom gelu i sekvenca se čita sa 4 paralelne trake na gelu (Maxam i Gilbert, 1977; Franca i sar, 2002). Daljim razvojem sekvenciranja došlo je do njegovog automatizovanja i sada su nukleotiditi obeleženi različitim bojama i fluoresciraju na različitim talasnim dužinama, a laserski se čitaju. Rezultati su prikazani u obliku hromatograma sa različito obojenim pikovima gde svaki predstavlja odgovarajući nukleotid na određenom mestu u sekvenci, istovremeno dajući uvida i u intenzitet signala njegovog očitavanja. Sa sve većim razvojem nauke, Sangerova metoda je postala ograničavajuća, jer se smatralo da bi trebalo da se omogući očitavanje velikog broja sekvenci paralelno. Nove tehnike DNK sekvenciranja su omogućile veću brzinu, tačnost i kvalitet dobijenih rezultata ali je samim tim i veća cena (Ansorge,



2009). Prvi znaci preokreta u sekvenciranju su bili 2005. godine sa objavljivanjem tehnologije „sequencing-by-synthesis“ kompanije 454 Life Sciences i „multiplex polony sequencing protocol“ od *George Church's lab* (Schuster, 2008). Ključna karakteristika „Next generation sequencing“ (NGS) je paralelizacija velikog broja reakcija sekvenciranja. Instrumenti 454, Illumina i SOLiD su instrumenti „Druge generacije sekvenciranja“. Cilj "Treće generacije sekvenciranja" je da se pojednostavi postupak i smanji cena reakcije. Jedan način da se to postigne je izbegavanje pripreme uzorka i amplifikacije pojedinačnih molekula, čime se smanjuju troškovi za reagense. Još jedna tendencija je korišćenje klasičnih sistema detekcije. „Single molecule real time (SMRT) sequencing“, „DNA nanoball sequencing“, „Nanopore sequencing“ i „Ion torrent“ pripadaju trećoj generaciji sekvenciranja (Gužvic, 2013). Platforma 4G je evoluirala veoma brzo i podrazumeva kombinaciju „single-molecule sequencing“ iz 3. generacije i integraciju tehnologije „nanopore“ (Srinivasan i Batra, 2014).

2.7 UKLANJANJE VIRUSA ŽIVOTINJA I LJUDI IZ VODE

Virusi često opstaju u životnoj sredini duže od bakterija pa je pri oceni mikrobiološkog kvaliteta vode nedovoljno pouzdano oslanjati se samo na bakterijske indikatore. U jednoj studiji, nakon pojave hepatitisa kod ljudi ispitani su uzorci vode i detektovani su HAV, rotavirusi i enterovirusi u uzorcima koji su bili bakteriološki ispravni. Pokazalo se da količina hlora jeste bila dovoljna da ukloni bakterije, ali ne i viruse. Ova studija je i ukazala na važnost uspostavljanja intenzivnijeg tretmana vode i češćeg testiranja vode na prisustvo patogenih virusa, a ne samo nakon pojave epidemija (Bosch, 1998).

Prečišćavanje otpadnih voda podrazumeva fizički, hemijski i biološki tretman u postrojenjima za prečišćavanje, kako bi se potpuno ili delimično eliminisale zagađujuće materije i obezbedila ekološki bezbedna voda pre ispuštanja u recipijent koji je obično površinska voda, tj. reka, jezero ili more (Masclaux i sar, 2013). Performanse sistema za prečišćavanje otpadnih voda se utvrđuju uglavnom samo za bakteriološke indikatore i smatraju se nedovoljnim za obezbeđivanje mikrobiološkog kvaliteta vode, jer nisu nužno povezane sa uklanjanjem virusa iz vode (Okoh i sar, 2010).



Fekalno zagađenje vode koja se koristi za piće i proizvodnju hrane predstavlja glavni zdravstveni problem (Masclaux i sar, 2013). Komunalne otpadne vode predstavljaju mešavinu ljudskih izlučevina, suspendovanih materija i mnoštvo hemikalija koje potiču od stambenih, poslovnih i industrijskih aktivnosti. Sirova kanalizaciona voda je glavni nosilac štetnih agenasa, naročito gastroenteričnih patogena i zato je tretman otpadnih voda od ključnog značaja za javno zdravlje. Enterični virusi ljudi se u vodi nalaze ili slobodni ili adsorbovani na čvrste čestice. Proces koagulacije, flokulacije, sedimentacije i filtracije mogu biti korisni za fizičko uklanjanje čestica. Neki virusi ne mogu da se uklone ovim procesima pa je potrebno da se primenjuju dezinfekcija hlorom, ozonom i UV zračenje. Kombinacija svih ovih procesa može ukloniti značajnu količinu virusa. Hlorisanje može da bude jedan od najefikasnijih tretmana za inaktivaciju HAV u vodi ali je veoma bitna koncentracija hlora. U nekim studijama je pokazano da je tretiranje procesima koagulacije, sedimentacije, filtracije i dezinfekcije efikasno za inaktivaciju HAV u vodi (Craven i sar, 2009). U konvencionalnim gradskim prečišćavima otpadne vode uglavnom se koriste samo fizički procesi kao što su taloženje i aktivni mulj što dovodi do zagađenja recipijenta virusima (Okoh i sar, 2010). U mnogim publikacijama je ustanovljeno da se stopa inaktivacije hepatitis A virusa (HAV) razlikuje u odnosu na druge viruse ili bakterije. Temperatura je jedan od bitnih faktora. Smatra se da niže temperature i prisustvo sedimenta u vodi može da poboljša opstanak virusa (Bosch, 1995).

Otpadna voda koja dospeva u postrojenje za prečišćavanje se naziva influent. On se tretira hemijskim, fizičkim i biološkim procesima nakon čega se izliva u reke i druge površinske vode tj. recipijente kao efluent. Najčešće, prva faza prečišćavanja otpadnih voda podrazumeva uklanjanje grubih, velikih ostataka (gruba rešetka). Zatim sledi druga faza, ili primarni tretman, kojim se uklanjaju čvrste materije i organska materija tako što se čvrste čestice talože a organska materija ostaje da pluta na površini. Sekundarni aerobni tretman podrazumeva asimilaciju makromolekula kao što su šećeri, proteini i deterdženti. Tercijarni tretman ili neorgansko uklanjanje nutrijenata, može biti od strane biljaka i mikroorganizama, pri čemu se npr. uklanjaju nitrati od strane bakterija u procesu denitrifikacije. Na kraju je proces dezinfekcije koji obično podrazumeva hlorisanje vode u cilju uništavanja patogena, a potom dehlorisanje pre ispuštanja u recipijent. Jedan od načina dezinfekcije je i primena UV zračenja jer je veoma efikasno za uništavanje bakterija, protozoa i virusa. Međutim, mnoge studije su pokazale da UV tretman nije efikasan pri



uništavanju adenovirusa ljudi, kao i nekih bakterija, npr. *Pseudomonas aeruginosa* (Quidort, 2013). Enterični virusi iz postrojenja za preradu otpadnih voda najčešće se uklanjaju kombinacijom ireverzibilne adsorpcije i inaktivacije dezinfekcionim sredstvima. Efikasnost uklanjanja virusa varira u zavisnosti od adsorptivne sposobnosti virusnih čestica i adsorbenta. Potencijalni adsorbenti virusa u površinskim vodama su pesak, glina, neke bakterije, koloidi i sedimenti. Nekoliko faktora utiče na interakciju virusa sa čvrstim česticama a neki od njih su izoelektrična tačka virusa i hidrofobnost adsorbenta. Dezinfekcija podrazumeva upotrebu hemijskih materija koje inaktivišu viruse oksidacijom ili inhibicijom ćelijske aktivnosti, dok UV zračenje sprečava replikaciju (Okoh i sar, 2010). Dezinfekcija sa niskim pritiskom monohromatskog ultraljubičastog (UVC) zračenja (253.7 nm) je postala važna tehnika za prečišćavanje vode za piće, a takođe i otpadne vode u terciarnim tretmanima (Calgua i sar, 2014). Najčešće je za inaktivaciju virusa najbolja kombinacija nekoliko procesa prečišćavanja i dezinfekcije.

2.8 DIREKTIVE I ZAKONI U SRBIJI

Direktiva o zaštiti vode za kupanje se donosi u cilju zaštite ljudi tokom rekreacije u površinskim vodama. Indikator organizmi koji bi trebali da se kontrolišu u delu mikrobiološke ispravnosti su fekalne koliformne bakterije i patogeni virusi u vodi. Prisustvo fekalnih koliformnih bakterija ne mora nužno biti u korelaciji sa prisustvom patogenih virusa u vodi (Lodder i sar, 2015). U Srbiji postoji veliki broj propisa koji uređuju oblast voda. Pored Zakona o vodama i podzakonskih akata, ovu oblast regulišu propisi o sistemu zaštite životne sredine, planiranju i uređenju prostora, izgradnji objekata, lokalnoj samoupravi, komunalnim delatnostima, rudarstvu i energetici, poljoprivredi i šumarstvu, plovidbi, geološkim istraživanjima, postupanju sa otpadom, koncesijama, stranim ulaganjima i dr. Međutim, nije obezbeđen osnov za integralno upravljanje vodama na prostoru Republike Srbije, u skladu sa principima održivog razvoja i uz poštovanje načela prihvaćenih u EU.



2.8.1 Okvirna direktiva o vodama

Problemi vezani za upravljanje vodama i zaštitu kvaliteta voda je pitanje kome Evropska unija (EU) pridaje veliki značaj. Ova tema postaje posebno aktuelna tokom procesa priključenja novih članica EU, jer su problemi vezani za zaštitu voda i životne sredine izraženiji u ekonomski manje razvijenim zemljama. Zato je ispunjenje zahteva i zadovoljenje standarda EU u oblasti voda sve važniji uslov evropskih integracija. Kako je priključenje Republike Srbije EU proces koji se očekuje, a saradnja sa EU jedan od prioriteta, i prilagođavanje evropskim standardima u svim oblastima jeste prioritet. Jedna od aktivnosti koja vodi ka usaglašavanju sa evropskim standardima je i primena Okvirne direktive o vodama EU - Water Framework Directive - Directive of European Parliament and of the Council 2000/60/EC – Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy (ODV) http://www.srbijavode.rs/sr-latin/home/voda_bez_granica/EU_regulativa_u_oblasti_voda.html, pristupljeno 25.05.2015.

Okvirna direktiva o vodama je usvojena 22. decembra 2000. godine. Osnovni ciljevi donošenja direktive WFD su: sveobuhvatna zaštita svih voda uz primenu načela integralnog upravljanja vodnim resursima, postizanje dobrog statusa voda u roku od 15 godina, integralno gazdovanje i upravljanje rečnim slivovima, kontrola kvaliteta voda i ispuštanja zagađenih voda, pravilno utvrđivanje cena vode na osnovu ključnih principa: „korisnik plaća“, „zagađivač plaća“, „potpuna nadoknada troškova“ i uključivanje javnosti u cilju informisanja, konsultovanja i učešća u odlučivanju.

2.8.2 Zakon o zaštiti životne sredine

Oblast zaštite prirode normativno je regulisana Zakonom o zaštiti prirode i drugim zakonskim i podzakonskim aktima koji se neposredno ili posredno odnose na prirodu i prirodna dobra. Zakon o zaštiti prirode ("Službeni glasnik Republike Srbije" br. 36/09 i 88/2010) kojim se uređuju zaštita i očuvanje prirode, biološka, geološka i predeona raznovrsnost je od izuzetnog značaja za normativno regulisanje ove oblasti, a takođe su značajna i mnoga podzakonska akta. Harmonizacija pravnih propisa iz oblasti zaštite životne sredine i prirode sa propisima EU je u toku. Takođe, unapređenju i usklađivanju zaštite prirode doprinosi i primena odredbi i principa međunarodnih konvencija čiji je naša zemlja



potpisnik [http://www.zzps.rs/novo/index.php?jezik=sr&strana=propisi zakoni](http://www.zzps.rs/novo/index.php?jezik=sr&strana=propisi_zakoni) (pristupljeno 25.05.2015.)

U članu 23. zakona o zaštiti životne sredine “Sl. glasnik RS”, br. 135/2004 se naglašava:

„Vode se mogu koristiti i opterećivati, a otpadne vode ispuštati u vode uz primenu odgovarajućeg tretmana, na način i do nivoa koji ne predstavlja opasnost za prirodne procese ili za obnovu kvaliteta i količine vode i koji ne umanjuje mogućnost njihovog višenamenskog korišćenja. Zaštita i korišćenje voda ostvaruje se u okviru integralnog upravljanja vodama sprovođenjem mera za očuvanje površinskih i podzemnih voda i njihovih rezervi, kvaliteta i količina, kao i zaštitom korita, obalnih područja i slivova, u skladu sa posebnim zakonom. Mere zaštite voda obezbeđuju sprečavanje ili ograničavanje unošenja u vode opasnih, otpadnih i drugih štetnih materija, praćenje i ispitivanje kvaliteta površinskih i podzemnih voda, kao i kvaliteta otpadnih voda i njihovo prečišćavanje“.

U “Sl. glasnik RS”, br. 36/09 u Članu 6. Zakona o izmenama i dopunama zakona o zaštiti životne sredine se navodi:

„Vode se mogu koristiti i opterećivati, a otpadne vode ispuštati u vode uz primenu odgovarajućeg tretmana, na način i do nivoa koji ne predstavlja opasnost za prirodne procese ili za obnovu kvaliteta i količine vode i koji ne umanjuje mogućnost njihovog višenamenskog korišćenja. Zaštita i korišćenje voda ostvaruje se u okviru integralnog upravljanja vodama sprovođenjem mera za očuvanje površinskih i podzemnih voda i njihovih rezervi, kvaliteta i količina, kao i zaštitom korita, obalnih područja i slivova, u skladu sa posebnim zakonom. Radi zaštite i očuvanja količina i kvaliteta podzemnih rezervi voda vrše se detaljni istražni radovi, kao i izrada bilansa rezervi podzemnih voda. Zaštita vode ostvaruje se preduzimanjem mera sistematskog i kontrolnog praćenja kvaliteta voda, smanjivanjem zagađivanja voda zagađujućim materijama ispod propisanih graničnih vrednosti i preduzimanjem tehničko-tehnoloških i drugih potrebnih mera za njihovo prečišćavanje, kako bi se sprečilo unošenje u vode opasnih, otpadnih i drugih štetnih materija, kao i praćenjem uticaja zagađenih voda na zdravlje ljudi, životinjski i biljni svet i životnu sredinu. Zaštita voda obuhvata i zaštitu voda od uticaja prekograničnog zagađenja, tako da se obezbeđuje očuvanje voda u celini“.



2.8.3 Zakon o vodama

Republika Srbija mora u narednom periodu promeniti svoj odnos prema vodi, pri čemu unapređenje društvene svesti o vodama, odnosno shvatanja prave uloge i značaja vode u razvoju društva predstavlja izuzetno važan cilj. Nedovoljno oslanjanje na savremene principe upravljanja vodama iziskuje potrebu da se kod nas ova oblast reguliše u skladu sa zakonodavstvom EU, uključujući i ekonomski aspekt. U “Sl. glasnik RS”, br. 30/2010 i 93/2012 se navodi: „Zakon o vodama uređuje pravni status voda, integralno upravljanje vodama, upravljanje vodnim objektima i vodnim zemljištem, izvore i načine finansiranja vodne delatnosti, nadzor nad sprovođenjem ovog zakona, kao i druga pitanja značajna za upravljanje vodama; daje osnov za niz podzakonskih akata i strateških i planskih dokumenata iz oblasti integralnog upravljanja vodama; propisuje prečišćavanje otpadnih voda, koje se ispuštaju u recipijent, do nivoa koji odgovara graničnim vrednostima emisije, odnosno do nivoa kojim se ne narušavaju standardi kvaliteta životne sredine recipijenta; Propisuje obaveze merenja količine i ispitivanja kvaliteta otpadnih voda.“ Član 98. zakona o vodama se odnosi na obavezu prečišćavanja otpadnih voda i navodi se da:

- „Pravno lice, preduzetnik, odnosno fizičko lice koje ispušta ili odlaže materije koje mogu zagaditi vodu dužno je da te materije, pre ispuštanja u sistem javne kanalizacije ili recipijent, delimično ili potpuno odstrani, u skladu sa ovim zakonom i posebnim zakonima koji uređuju oblast zaštite životne sredine, odnosno propisa donetih na osnovu tih zakona.
- Pravno lice, preduzetnik, odnosno fizičko lice koje ispušta otpadnu vodu neposredno u recipijent dužno je da obezbedi prečišćavanje otpadnih voda do nivoa koji odgovara graničnim vrednostima emisije, odnosno do nivoa kojim se ne narušavaju standardi kvaliteta životne sredine recipijenta (kombinovani pristup), uzimajući strožiji kriterijum od ova dva.
- Radi obezbeđivanja prečišćavanja otpadnih voda, pravno lice, odnosno preduzetnik koje ispušta otpadnu vodu u recipijent ili javnu kanalizaciju dužno je da obezbedi sredstva i utvrdi rokove za izgradnju i pogon tih uređaja, u skladu sa planom zaštite voda od zagađivanja i posebnim zakonima koji uređuju oblast zaštite životne sredine. Akt o ispuštanju otpadnih voda u javnu kanalizaciju donosi nadležni organ jedinice lokalne samouprave“.



3 CILJ ISTRAŽIVANJA



Cilj disertacije je da se utvrdi i analizira prisustvo odabranih animalnih i humanih virusa (humani adenovirus, norovirus, adenovirus svinja, poliomavirus goveda, hepatitis A i hepatitis E virus) u površinskim vodama na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine (Republika Srbija), primenom najsavremenijih metoda koncentrovanja i molekularnih metoda detekcije virusa, koje se pripremaju ili se tek uvode u programe nadzora prisustva virusa u vodi u nekim visoko ekonomski razvijenim zemljama.

Očekivani rezultati su prisustvo humanih i animalnih patogenih virusa, kao i zoonotskih virusa u fekalno kontaminiranim vodama, odnosno, njihovo odsustvo u uzorcima vode koja nije pod uticajem otpadnih voda. Dobijeni rezultati će dati odgovore na sledeća pitanja:

- da li se i koliko uspešno mogu koristiti razvijene savremene metode koncentrovanja virusa u vodi i molekularne metode detekcije virusne kontaminacije površinskih voda;
- da li se primenjene metode mogu koristiti za rutinski nadzor virusološke ispravnosti površinskih voda, ukoliko to u budućnosti postane zahtev kontrole kontaminacije životne sredine;
- da li su animalni i humani virusi prisutni u površinskim vodama na području Vojvodine;
- kolika je prevalenca pojedinih virusa u ispitivanim vodama na analiziranom području;
- da li su infekcije navedenih virusa prisutne u populaciji životinja i ljudi, što će biti utvrđeno indirektnim putem i
- da li postoji rizik za zdravlje životinja i ljudi na području koje gravitira ispitanim površinskim vodama.

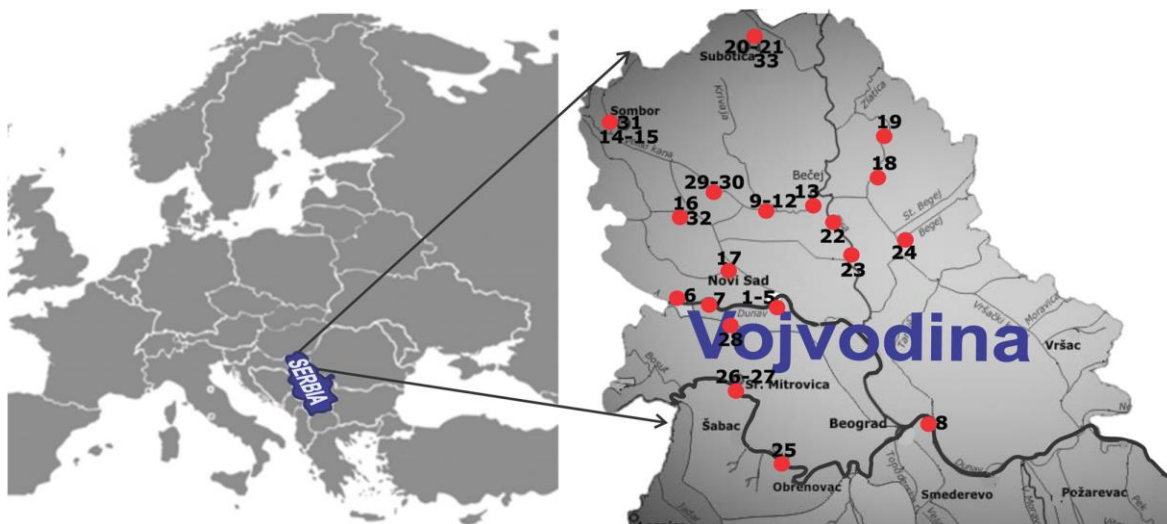


4 MATERIJAL I METODE



4.1 Uzorci površinskih voda

U radu su korišćeni uzorci površinskih voda sa teritorije Autonomne Pokrajine Vojvodine, na 30 odabranih lokaliteta. Odabrani lokaliteti su se nalazili u blizini većih gradova, na mestima nakon ispusta otpadnih kanizacionih voda iz naseljenih mesta, u blizini farmi, u zaštićenim prirodnim područjima i na gradskim plažama, a sve u cilju procene prisustva reprezentativnih virusa u njima. Takođe, sa tri lokaliteta je uzorkovana gradska kanalizacija, od kojih su dva pre uliva u prečistač otpadnih voda, a potom i izlivi iz prečistača u površinske vode (Subotica i Sombor), a jedan je bio netretirana kanizaciona voda (Odžaci, gde prečistač ne postoji i otpadna voda se direktno uliva u kanal Dunav-Tisa-Dunav) (Sl.12). Fotografije lokaliteta u daljem tekstu (Sl.14 - Sl.47, osim Sl.43 i 46) su načinjene pri prvom uzorkovanju svakog od lokaliteta.



Slika 12. Lokaliteti uzorkovanja na području Autonomne Pokrajine Vojvodine u Srbiji

Legenda: 1.Dunav - GC-1 Novi Sad; 2.Dunav - GC-2 Novi Sad; 3.Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad; 4.Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad; 5.Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad; 6.Dunav - Plavna; 7.Dunav - Karađorđevo; 8.Dunav - Pančevo; 9.Krivaja -Srbobran - pored farme goveda; 10.Krivaja - Srbobran - između 2 farme; 11.Krivaja - Srbobran - farma svinja 1; 12.Krivaja - Radičević - crpna stanica nizvodno od farme svinja 2; 13.Krivaja - Radičević - pored farme goveda, svinja i pilića; 14.Mostonga, DTD kanal - posle TP; 15.DTD kanal - Sombor; 16.DTD kanal - Odžaci; 17.DTD kanal - Bački Petrovac; 18.DTD kanal - Melenci-Bašaid; 19.DTD kanal - Kikinda; 20.Paličko jezero - posle TP; 21.Paličko jezero - plaža; 22.Tisa - Čurug - plaža; 23.Jegrička - Žabalj; 24.Begej - Zrenjanin; 25.Obedska bara - Obrež; 26.Sava - Sr. Mitrovica-plaža; 27.Sava-Sr.Mitrovica; 28.Rakovački potok - Rakovac; 29.Veliki bački kanal - Vrbas; 30.KCIII kanal - Vrbas; 31.Gradska kanalizacija Sombor; 32.Gradska kanalizacija Odzaci; 33.Gradska kanalizacija Subotica, Palić.



Prvo uzorkovanje je izvršeno tokom zime (oktobar-decembar) 2012. godine na tri lokaliteta i ukupno 9 tačaka uzorkovanja. Nakon toga, u tri uzorkovanja tokom tri različite sezone (leto (jun-oktobar) 2013, jesen/zima (novembar-decembar) 2013. i proleće (mart-jun) 2014. godine) sakupljeno je po 30 uzoraka površinskih voda sa 30 lokaliteta i 3 uzorka gradske kanalizacione vode sa 3 lokaliteta. Ukupno je sakupljeno 108 uzoraka sa 33 lokaliteta (Tab.2).

Tabela 2. Lokalizeti i vreme uzorkovanja

Lokalitet	2012			2013				2013		2014			
	X	XI	XII	VI	VII	IX	X	XI	XII	III	IV	V	VI
1. Dunav - GC-1 Novi Sad	●	●	●	/	/	●	/	●	/	/	/	/	●
2. Dunav - GC-2 Novi Sad	●	●	●	/	/	●	/	●	/	/	/	/	●
3. Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	●	●	●	/	/	●	/	●	/	/	/	/	●
4. Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	/	/	/	/	●	/	/	●	/	●	/	/	/
5. Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	/	/	/	/	●	/	/	●	/	●	/	/	/
6. Dunav - Plavna	/	/	/	/	/	/	●	/	●	/	/	/	●
7. Dunav - Karađorđevo	/	/	/	/	/	/	●	/	●	/	/	/	●
8. Dunav - Pančevo	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda	/	/	/	●	/	/	/	●	/	/	/	/	●
10. Krivaja - Srbobran - između 2 farme	/	/	/	●	/	/	/	●	/	/	/	/	●
11. Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	/	/	/	●	/	/	/	●	/	/	/	/	●
12. Krivaja - Radičević - farma svinja 2	/	/	/	●	/	/	/	●	/	/	/	/	●
13. Krivaja - Radičević - farma 3	/	/	/	●	/	/	/	●	/	/	/	/	●
14. Mostonga, DTD kanal - posle TP	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
15. DTD kanal - Sombor	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
16. DTD kanal - Odžaci	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
17. DTD kanal - Bački Petrovac	/	/	/	/	/	●	/	●	/	●	/	/	/
18. DTD kanal - Melenci-Bašaid	/	/	/	●	/	/	/	●	/	/	/	/	●
19. DTD kanal - Kikinda	/	/	/	●	/	/	/	●	/	/	/	/	●
20. Paličko jezero - posle TP	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
21. Paličko jezero- plaža	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
22. Tisa - Čurug - plaža	/	/	/	/	●	/	/	●	/	/	●	/	/
23. Jegrička - Žabalj	/	/	/	/	●	/	/	●	/	/	●	/	/
24. Begej - Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	●	●	/	/	●	/	/
25. Obedska bara - Obrež	/	/	/	/	/	/	●	●	/	/	/	/	●
26. Sava - Sr. Mitrovica-plaža	/	/	/	/	/	/	●	●	/	/	/	/	●
27. Sava - Sr. Mitrovica	/	/	/	/	/	/	●	●	/	/	/	/	●
28. Rakovački potok - Rakovac	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
29. Veliki bački kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	●	/	●	/	●	/	/
30. KCIII kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	●	/	●	/	●	/	/
31. Gradska kanalizacija Sombor	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
32. Gradska kanalizacija Odzaci	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/
33. Gradska kanalizacija Subotica, Palić	/	/	/	/	/	/	●	/	●	●	/	/	/

Legenda: 1-30-Lokaliteti uzorkovanih površinskih voda; 31-33-Lokaliteti uzoraka gradske kanalizacione vode; III-XII -Meseci tokom kojih je vršeno uzorkovanje; „●“ Izvršena uzorkovanja; „/“ nisu vršena uzorkovanja; TP-tretman prečišćavanja



Svi uzorci površinskih i kanalizacionih voda su sakupljeni u aseptične kontejnere od 10 L (Sl.13), nakon čega su u kratkom vremenskom periodu transportovani u laboratoriju i čuvani u frizideru najviše 24 sata do postupka koncentrovanja vode. Uzorci kod kojih nije odmah rađena ekstrakcija nukleinskih kiselina su čuvani na -70°C . Takođe, nakon urađene ekstrakcije nukleinskih kiselina, ekstrakt je čuvan na pomenutoj temperaturi do testiranja na prisustvo virusa.



Slika 13. Kontejneri za uzorke vode

4.1.1 Uzorci vode reke Dunav

Dužina Dunava je 2857 km, a površina sliva 817.000 km². Korito Dunava proteže se kroz teritorije 10 zemalja (Nemačka, Austrija, Slovačka, Mađarska, Hrvatska, Srbija, Bugarska, Rumunija, Ukrajina, Moldavija). Deonica kroz Srbiju iznosi 588 km, a na dužini od 230 km teče državnom granicom. Resursi Dunava se koriste za snabdevanje tehničkom vodom stanovništva, industrije, poljoprivrede, hidroenergetike, za plovidbu, ribarstvo, turizam, rekreaciju i drugo (Penčev i Pinka, 2015).

Lokaliteti uzorkovanja reke Dunav bili su sledeći:

- GC-1 Novi Sad (WGS 45°15'06.408"N; 19°51'22.916"E), lokalitet br.1 (Sl.14),



- GC-2 Novi Sad (WGS 45°15'44.198"N; 19°51'28.359"E), lokalitet br.2 (Sl.15),
- plaža Oficirac Novi Sad (WGS 45°15'43.806"N; 19°51'51.223"E), lokalitet br.3 (Sl.16)
- plaža Štrand 1 Novi Sad (WGS 45°14'11.22"N; 19°50'54.69"E), lokalitet br.4 (Sl.17),
- plaža Štrand 2 Novi Sad (WGS 45°14'5.98"N; 19°50'48.25"E), lokalitet br.5 (Sl.17),
- Plavna (WGS 45°19'23.38"N; 19°7'3.92"E), lokalitet br.6 (Sl.18),
- Karadjordjevo (WGS 45°15'53.325"N;19°16'15.998"E), lokalitet br.7 (Sl.19) i
- Pančevo (WGS 44°50'46.83"N; 20°38'12.40"E), lokalitet br.8, (Sl.20).

U Novom Sadu dva lokaliteta su izabrana nizvodno od izliva kanalizacije GC-1 i GC-2 kako bi se utvrdilo moguće prisustvo virusa i ukazalo na kontaminaciju vode poreklom od ljudi i životinja. Glavna crpna stanica GC-1 prihvata otpadne i atmosferske vode dela grada koji se nalazi južno od Futoške i Jevrejske ulice do Dunava, kao i otpadne vode Veternika i Futoga, a izliv ove crpne stanice nalazi se uz šetalište duž obale Dunava, na početku Bulevara cara Lazara i Radničke ulice i okupira jednu od najatraktivnijih lokacija u gradu. Izliv kanalizacije severnog sliva je pomeren nizvodno i nalazi se u neposrednoj blizini drumsko železničkog mosta, pa crpna stanica GC-2 prihvata otpadne vode severnog dela grada od Futoške pijace <http://www.novisad.rs/lat/centralni-gradski-precistac-otpadnih-voda> (pristupljeno 01.06.2015.). U Novom Sadu je uzorkovanje plaže „Štrand“ na dve lokacije (levo i desno od Mosta Slobode) i plaže „Oficirac“ na jednom lokalitetu izvršeno u cilju utvrđivanja potencijalnog rizika za kupaće. Takođe na dva lokaliteta: lovište „Plavna“ i SRP „Karađorđevo“ (lovište Karađorđevo) su veoma bitne lokacije na kojima je vršeno uzorkovanje jer su manje opterećenje otpadnim vodama, tako da su ti lokaliteti uzorkovani kao pretpostavljeno manje kontaminirani delovi Dunava. U Pančevu se gradska kanalizacija izliva u Dunav i postojala je pretpostavka da je moguće utvrditi prisustvo virusa, zbog čega je uzorkovanje vršeno i na ovom lokalitetu.



Slika 14. Lokalitet uzorkovanja br.1. Dunav - GC-1 Novi Sad



Slika 15. Lokalitet uzorkovanja br.2. Dunav - GC-2 Novi Sad



Slika 16. Lokalitet uzorkovanja br.3. Dunav, plaža Oficirac Novi Sad



Slika 17. Lokaliteti uzorkovanja br.4. i 5. Dunav, plaža Štrand 1. i 2. Novi Sad



Slika 18. Lokalitet uzorkovanja br.6. Dunav - Plavna



Slika 19. Lokalitet uzorkovanja br.7. Dunav - Karađorđevo



Slika 20. Lokalitet uzorkovanja br.8. Dunav - Pančevo

4.1.2 Uzorci vode reke Krivaja

Područje sliva reke Krivaje obuhvata severni i središnji deo Bačke. Tok Krivaje karakteriše relativno velika širina u odnosu na dubinu, mali proticaj i izrazito meandriranje kao posledica malog proticaja i konfiguracije terena, a obale su uglavnom obrasle trskom i drugim barskim biljem. Na slivu prevladava tradicionalna poljoprivredna proizvodnja koja podrazumeva nedovoljno kontrolisanu upotrebu đubriva i pesticida koji ugrožavaju kvalitet zemljišta, površinskih i podzemnih voda. Krivaja predstavlja recipijent za petnaest registrovanih i neutvrđen broj neregistrovanih zagađivača, koji svoje otpadne vode direktno ili preko manjih kanala ispuštaju u ovu reku. Kako su ovi kanali sporotekući i sa malom količnom vode (naročito u letnjem periodu), njima većim delom godine teče otpadna voda (Acimovic i Leles, 2013).

Lokaliteti uzorkovanja reke Krivaje bili su:

- u blizini farme goveda u Srbobranu (WGS 45°37'48.10"N; 19°42'45.00"E), lokalitet br.9. (Sl.21),



- između dve farme u Srbobranu (WGS 45°35'42.19"N; 19°44'19.63"E), lokalitet br.10 (Sl.22),
- u blizini farme svinja 1 u Srbobranu (WGS 45°35'5.41"N; 19°45'5.18"E), lokalitet br.11 (Sl.23),
- crpna stanica nizvodno od farme svinja 2 (WGS 45°34'16.380"N; 19°50'49.345"E), lokalitet br.12 (Sl.24) i
- u blizini farme 3 - farma goveda, svinja i pilića (WGS 45°35'28.92"N; 19°58'25.07"E), lokalitet br.13 (Sl.25).



Slika 21. Lokalitet uzorkovanja br.9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda



Slika 22. Lokalitet uzorkovanja br.10 Krivaja - Srbobran - između dve farme



Slika 23. Lokalitet uzorkovanja br.11. Krivaja - farma svinja 1



Slika 24. Lokalitet uzorkovanja br.12. Krivaja - farma svinja 2



Slika 25. Lokalitet uzorkovanja br.13. Krivaja - farma 3

4.1.3 Uzorci vode kanala Dunav-Tisa-Dunav

Kanal Dunav–Tisa–Dunav (DTD) je jedinstveni sistem kanala protiv poplava kao i za navodnjavanje zemljišta, plovni put, recipijent za otpadne vode, ali i u svrhu turizma, lova i ribolova. Dunav-Tisa-Dunav je sistem kanala koji se protežu na oko 12.700 km², između reka Dunav i Tisa, u Bačkoj i Banatu, na teritoriji Vojvodine. Ukupna dužina kanala je 929 km, uključujući nove i stare kanale i pritoke koje su bile cele ili delom obnovljene i integrisane u sistem kanala. U mreži kanala postoje 51 objekta-24 kapije, 16 prevodnica, 5 sigurnosnih kapija, 6 pumpi, kao i 180 mostova. Ova mreža kanala omogućava sušenje oko 700.000 ha zemljišta i navodnjavanje 50.000 ha. Moguća plovidba kanalom je 664 km. U sistemu kanala nalazi se 14 luka za utovar-istovar tereta <http://www.vodevojvodine.com/>

Lokaliteti uzorkovanja vode iz DTD kanala bili su sledeći:

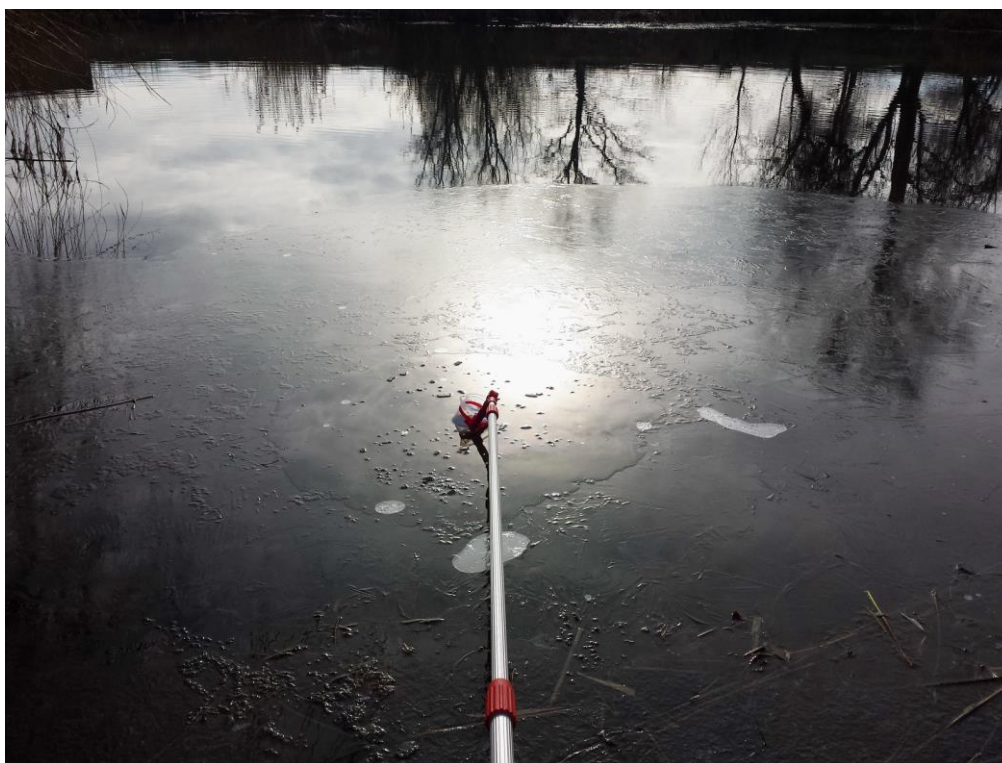
- Sombor nakon izliva prečišćene vode u Mostonga - DTD (WGS 45°44'56.20"N; 19°6'41.81"E), lokalitet br.14 (Sl.26),
- Sombor (WGS 45°44'25.778"N; 19°06'46.954"E), lokalitet br.15 (Sl.27),
- Odžaci (WGS 45°32'8.66"N; 19°18'9.37"E), lokalitet br.16 (Sl.28),
- Bački Petrovac (WGS 45°22'13.28"N; 19°36'42.50"E), lokalitet br.17 (Sl.29),



- Melenci-Bašaid (WGS 45°32'34.06"N; 20°20'15.76"E), lokalitet br.18 (Sl.30) i
- Kikinda (WGS 45°48'55.57"N; 20°25'9.94"E), lokalitet br.19 (Sl.31).



Slika 26. Lokalitet uzorkovanja br.14 Mostonga, DTD kanal



Slika 27. Lokalitet uzorkovanja br.15. DTD kanal - Sombor



Slika 28. Lokalitet uzorkovanja br.16. DTD kanal - Odžaci



Slika 29. Lokalitet uzorkovanja br.17. DTD kanal - Bački Petrovac



Slika 30. Lokalitet uzorkovanja br.18. DTD kanal - Melenci-Bašaid



Slika 31. Lokalitet uzorkovanja br.19. DTD - Kikinda



4.1.4 Uzorci vode Paličkog jezera

Paličko jezero se nalazi 8 km od Subotice, pored mesta Palić i predstavlja značajni turistički centar Vojvodine. Jezero je eolskog porekla i predstavlja najveće jezero u Srbiji nastalo prirodnim putem. Deo je zaštićenog područja Park prirode Palić. Jezero zahvata površinu od 4,6 km². Prosečna dubina jezera je 1,9 m, najveća je 3,5 m, a turistički sektor zahvata 3,8 km² sa tri posebne plaže. Jezero je podeljeno na četiri sektora <http://palic.org/palickojezero> (pristupljeno 01.06.2015.).

Lokaliteti uzorkovanja na jezeru Palić su bili:

- izliv prečišćene kanalizacione vode (WGS 46° 4'54.10"N; 19°41'55.85"E), lokalitet br.20 (Sl.32) i
- kupalište muški štrand (WGS 46° 5'24.87"N; 19°45'48.71"E), lokalitet br.21 (Sl.33).



Slika 32. Lokalitet uzorkovanja br.20. Paličko jezero - posle tretmana prečišćavanja



Slika 33. Lokalitet uzorkovanja br.21. Paličko jezero - plaža

4.1.5 Uzorci vode reke Tisa

Tisa je najveća pritoka Dunava i međunarodna reka, koja protiče kroz četiri države (Ukrajina, Rumunija, Mađarska, Srbija), a slivna površina prostire se i na područje Slovačke. Ukupne je dužine 966 km i tipična je ravničarska reka. Izvire u Karpatima i jedna je od najstarijih reka na svetu. Kroz Srbiju Tisa protiče u dužini od 160 km. Park prirode „Stara Tisa“ je upravo mesto gde je uzorkovana voda <http://turizamusrbiji.rs/reka-tisa/> (pristupljeno 01.06.2015.).

Lokalitet uzorkovanja reke Tise bila je plaža u Čurugu (Stara Tisa) (WGS 45°28'43.19"N; 20°3'53.40"E), lokalitet br.22 (Sl.34).



Slika 34. Lokalitet uzorkovanja br.22. Tisa - plaža u mestu Čurug

4.1.6 Uzorci vode reke Jegrička

Zaštićeno područje Park prirode „Jegrička“ nalazi se na prostoru južne bačke lesne terase, između Malog bačkog kanala kod Despotova, na zapadu, i njenog ušća u Tisu kod Žablja, na istoku. Zaštićeno prirodno dobro smešteno je na površini od 1.193,19 ha. Park prirode „Jegrička“ prostire se na području opština: Bačka Palanka, Vrbas, Temerin i Žabalj (Misković i sar, 2009).

Lokalitet uzorkovanje reke Jegričke bio je u mestu Žabalj (WGS 45°23'14.72"N; 20°4'6.86"E), lokalitet br.23 (Sl.35).



Slika 35. Lokalitet uzorkovanja br.23. Jegrička u mestu Žabalj

4.1.7 Uzorci vode reke Begej

Begej je glavna pritoka Tise u Srbiji. Izvire u Rumuniji, dug je 284 km, a krajem 19. i početkom 20. veka je kanalisan tako što je pomoću dva kanala uzvodno od Temišvara spojen sa rekom Tamiš, pa su im dotoci postali međusobno zavisni. Dužina plovnog Begeja iznosi 114 km, dopire do Temišvara, a njegova dužina kroz Srbiju iznosi 75,4 km na levoj i 77,2 km na desnoj obali gde je i presečen državnom granicom <http://www.zrenjanin.rs/1-95-19-0/Reka-Begej> (pristupljeno 01.06.2015.).

Lokalitet uzorkovanja reke Begej bio je u centru grada Zrenjanina (WGS 45°22'44.42"N; 20°23'49.92"E), lokalitet br.24 (Sl.36).



Slika 36. Lokalitet uzorkovanja br.24. Begej - Zrenjanin

4.1.8 Uzorci vode Specijalnog rezervata prirode Obedska bara

Specijalni rezervat prirode Obedska bara je ostatak meandra starog korita reke Save čiji glavni tok danas teče južnije. Njeno korito, na čijem su obodu sela Obrež i Kupinovo, se zbog svog oblika naziva „Potkovicica“. Zbog svojih izuzetnih prirodnih vrednosti, Obedska bara se nalazi na listi Vlažnih područja Ramsarske konvencije od 1977. godine kao prvo u našoj zemlji, a proglašena je 1989. godine i za međunarodno značajno stanište ptica (IBA) <http://www.vojvodinasume.rs/zastita-zivotne-sredine/obedska-bara/> (pristupljeno 01.06.2015.) Lokalitet uzorkovanja u SRP Obedska bara bio je u mestu Obrež (WGS 44°44'8.56"N; 19°59'16.07"E), lokalitet br.25 (Sl.37).

Ovaj uzorak površinske vode je takođe uzorkovan nakon poplava koje su se desile u maju 2014. godine.



Slika 37. Lokalitet uzorkovanja br.25. Obedska Bara - Obrež

4.1.9 Uzorci vode reke Sava

Izvorište Save je na ograncima Julijskih Alpa i Karavanki. Od spoja Save Dolinjske i Save Bohinjske do ušća u Dunav, Sava teče u dužini od 810 km. Ona je skoro dvostruko bogatija vodom od Tise, iako po površini sliva manja, i vodom je najbogatija pritoka Dunava <http://www.plovput.rs/> (pristupljeno 01.06.2015.).

Lokaliteti uzorkovanja reke Save bili su:

- plaža u Sremskoj Mitrovici (WGS 44°57'41.03"N; 19°36'43.17"E), lokalitet br.26 (Sl.38) i
- nizvodno od izliva gradske kanalizacije u Sremskoj Mitrovici (WGS 44°57'41.00"N;19°37'50.83"E), lokalitet br.27 (Sl.39).

U maju mesecu 2014. godine jedan od gradova koji je bio pogođen poplavama je i Sremska Mitrovica. Ova dva uzorka su iz tog razloga uzorkovana u junu mesecu, nakon opadanja vodostaja posle poplava.



Slika 38. Lokalitet uzorkovanja br.26. Sava - Sr. Mitrovica - plaža



Slika 39. Lokalitet uzorkovanja br.27. Sava - Sr. Mitrovica



4.1.10 Uzorci vode Rakovačkog potoka

Rakovački potok izvire na Fruškoj gori i teče padinama Fruške gore kroz selo Rakovac.

Lokalitet uzorkovanja Rakovačkog potoka bio je u mestu Rakovac (WGS 45°11'10.248"N; 19°46'22.418"E), lokalitet br.28 (Sl.40).



Slika 40. Lokalitet uzorkovanja br.28. Rakovački potok - Rakovac

4.1.11 Uzorci vode Velikog bačkog kanala

Veliki bački kanal (VBK) je deo sistema Dunav-Tisa-Dunav. Dugačak je 118 km i povezuje Dunav (kod Bezdana) sa Tisom (kod Bečeja). Između dva spomenuta mesta skraćuje put za više od 200 km, a koristi se i za vodoopskrbu ovog dela Bačke u doba suše. Korito Velikog bačkog kanala je široko 17 m, na površini kanal je širok oko 25 m. Prosečna dubina kanala je 3 m. Prokopavanje kanala je počelo 1793. godine <http://www.vrbas.net/> (pristupljeno 01.06.2015.).

Lokalitet uzorkovanja VBK nalazi se u Vrbasu kod Vinogradskog mosta (WGS 45°34'44.78"N; 19°37'55.09"E), lokalitet br.29 (Sl.41).



Slika 41. Lokalitet uzorkovanja br.29. Veliki bački kanal - Vrbas

4.1.12 Uzorci vode KCIII kanala

KC III kanal je lateralni kanal za navodnjavanje i odvodnjavanje koji se direktno uliva u Veliki bački kanal ispod Vrbaške prevodnice na Šlaisu. Stajnjak sa farme svinja, koji se izbacuje u taložnice, tzv. lagune, proceđuje se i bez ikakvog tretmana izliva u lateralni kanal KC III <http://www.vrbas.net/> (pristupljeno 01.06.2015.).

Lokalitet uzorkovanja KC III kanala je bio na mestu pre ulivanja u VBK (WGS 45°35'4.56"N; 19°37'20.14"E), lokalitet br. 30 (Sl.42).



Slika 42. Lokalitet uzorkovanja br.30. KCIII kanal - Vrbas

4.1.13 Uzorci vode iz uređaja za prečišćavanje otpadnih voda (UPOV) Sombor

Generalna koncepcija evakuacije otpadnih voda grada Sombora predviđa zajedničko odvođenje i prečišćavanje upotrebljenih voda domaćinstva i industrije. Sistem kanisanja je separatan što znači da se posebno odvodi atmosferska, a posebno komunalna kanalizaciona voda. Vodoprijemnik za prečišćene otpadne vode je Mostonga, odnosno kanal Dunav-Tisa-Dunav. Pošto prvi uređaj za prečišćavanje, izgrađen 1964. godine nije zadovoljavao razvojne potrebe grada, na osnovu Studije o otpadnim vodama grada i industrije, izgrađen je novi Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda (UPOV), koji je pušten u rad 1985. godine. Generalna koncepcija evakuacije otpadnih voda grada Sombora predviđa zajedničko odvođenje i prečišćavanje upotrebljenih voda domaćinstva i industrije. Sistem kanisanja je separatan (posebno atmosferska, posebno fekalna kanalizacija). Vodoprijemnik za prečišćene otpadne vode je reka Mostonga, odnosno kanal Dunav-Tisa-Dunav. Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda (UPOV) pušten je u rad 1985. godine. Lokacija uređaja se nalazi u području Rokovci, sa južne strane grada Sombora. Uređaj za



prečišćavanje se sastoji od dve tehnološke celine, linije vode i linije mulja. Na liniji vode je primenjen konvencionalan postupak prečišćavanja putem biološki aktivnog mulja. Na liniji mulja se primenjuje postupak anaerobne digestije u mezofilnom temperaturnom području sa mehaničkom dehidracijom mulja (Sl.43) <http://www.vodokanal.co.rs/6/Odvodjenje-i-preciscavanje-upotrebljenih-voda> (pristupljeno 28.05.2015.).



*Slika 43. Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda - Sombor
(<http://www.vodokanal.co.rs/>, pristupljeno 28.05.2015.)*

Lokalitet uzorkovanja gradske kanalizacije bio je na mestu ulaska kanalizacije u prečištač u Somboru (WGS 45°45'3.51"N; 19°6'41.58"E), lokalitet br.31 (Sl.44).



Slika 44. Lokalitet uzorkovanja br.31. UPOV Sombor

4.1.14 Kanalizaciona voda u mestu Odžaci

Grad Odžaci još uvek ne poseduje prečistač za otpadne kanalizacione vode. Gradska kanalizacija se izliva u lateralni kanal, a potom u recipijent DTD kanal.



Lokalitet uzorkovanja gradske kanalizacione vode u Odžacima je bio na mestu pre izlivanja gradske kanalizacione vode u DTD (WGS 45°31'13.087"N; 19°16'20.914"E), lokalitet br.32 (Sl.45).



Slika 45. Lokalitet uzorkovanja br.32 Kanalizaciona voda - Odžaci

4.1.15 Uzorci vode iz uređaja za prečišćavanje otpadnih voda (UPOV) Subotica

Intenzivno i stručno bavljenje problematikom vodovodne i kanalizacione mreže u Subotici potiče iz 1962. godine osnivanjem preduzeća Vodovod u Subotici. Odlukom Skupštine Opštine usvaja se da će Subotica imati mešoviti sistem kanalisanja, što znači da se istim vodovima odvodi i otpadna i atmosferska voda. Potreba za daljim poboljšanjem prečišćavanja otpadnih voda, a sve u cilju što kvalitetnije izlazne vode izrađen je projekat pod naslovom „Rehabilitacija i dogradnja postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda opštine Subotica“. Na osnovu konfiguracije terena, grad je podeljen na osam slivova, pa na osnovu ovoga postoji osam glavnih sabirnih kanala - kolektora od 0-VII. Recipijent prečišćenih otpadnih voda je jezero Palić <http://www.vodovodsu.rs/50-Otpadne-vode> (pristupljeno 01.06.2015.).



Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda u gradu Subotici takođe se sastoji od dve tehnološke celine, linije vode i linije mulja. Tok linije vode podrazumeva sledeće procese: Otpadne vode iz grada ⇒ gruba rešetka ⇒ pužne pumpe ⇒ fina rešetka ⇒ peskolov ⇒ prethodni taložnik za uklanjanje primarnog mulja ⇒ aeracioni bazeni za mešanje sveže vode sa bioaktivnim muljem ⇒ mikroorganizmi razgrađuju organske materije ⇒ razgradnja jedinjenja azota i fosfora ⇒ razdvajanje vode i mulja u naknadnim taložnicima. Tok linije mulja: ⇒ Mulj koji se taloži u primarnim i sekundarnim taložnicima – proizvodnja biogasa ⇒ zgušnjavanje primarnog i sekundarnog mulja ⇒ u digestorima “kuvačima mulja” pomoću mikroorganizama na stalnoj temperaturi stvara se ⇒ biogas ⇒ energent – gorivo za grejanje mulja i proizvodnju električne energije (≈50 % sopstvenih potreba) ⇒ dodavanje flokulanata i presovanje mulja ⇒ bezbedno odlaganje – deponovanje mulja bez štetnih sastojaka (Sl.46) (Pejčić, 2012).



*Slika 46. Uređaj za prečišćavanje otpadnih voda - Subotica
(www.vodovodsu.rs, pristupljeno 28.05.2015.)*

Lokalitet uzorkovanja gradske kanalizacije bio je na mestu ulaza kanalizacione vode u prečištač u Subotici (WGS 46° 4'56.73"N; 19°41'44.37"E), lokalitet br. 33 (Sl.47).



Slika 47. Lokalitet uzorkovanja br.33. UPOV Subotica



4.2 Metode

4.2.1 Priprema uzoraka i koncentrovanje virusa iz uzoraka vode

Virusi iz deset litara uzorka netretirane i tretirane površinske vode ili 5 litara netretirane gradske kanalizacione vode su koncentrisani tehnikom adsorpcije/elucije, koja je podrazumevala adsorpciju (vezivanje) virusa filtriranjem vode kroz staklenu vunu, a potom eluciju (odvajanje virusnih čestica sa staklene vune) ekstraktom goveđeg mesa, flokulaciju, centrifugiranje i resuspendovanje u PBS.

Pre metode koncentrisanja virusa iz vode bilo je neophodno pripremiti uzorak. U 10 L vode je dodato 10 µl procesne kontrole (Murine norovirus 1; MNoV-1) koja je korišćena kao kontrola procesa koncentrovanja virusa i ekstrakcije nukleinskih kiselina iz uzoraka (kontrola da li su ti postupci uspešno izvedeni). Korišćen je isključivo MNoV-1 iz razloga što je po strukturi i svojim drugim osobinama veoma sličan norovirusu ljudi i drugim enterovirusima i najrealnije može prikazati šta se dešava i sa pomenutim virusima ukoliko ih ima u uzorku vode tj. koliki je prinos koncentrovanja (eng. *recovery*). Nakon dodavanja procesne kontrole podešena je pH vrednost uzorka vode na 3,5 jer u kiseljoj sredini virusi kristališu i bolje se adsorbuju na filter koji je negativno naelektrisan a kroz koji se propušta uzorak vode. Metodu koncentrisanja su opisali Vilagines i sar. (1993), dopunili Wyn-Jones i sar. (2011) i detaljno opisali Kokkinos i sar. (2012). Filter staklene vune je napravljen presovanjem 10 g staklene vune (*BOURRE 725 QN, Isover Saint-Gobain, Francuska*) u plastičnu kolonu visine 30 cm i prečnika 3 cm, pri čemu je visina filtera bila 6-8 cm (SI.48). Pre filtriranja uzorka pripremljen je filter za adsorpciju virusnih čestica, ispiranjem sa 50 ml 1N HCl, nakon toga sa 50 ml vode iz česme, a nakon toga sa 50 ml 1N NaOH, a zatim ispiranjem sa 1 L dejonizovane vode kako bi pH filtera bio neutralan. Ispiranje se vršilo slobodnim padom. Nakon pripreme filtera kroz njega se propustio uzorak vode koristeći vakum pumpu (*Millipore Masterflex L/S Easy-Load*, Merck KGaA, Nemačka) ali ne brže od 1 L/min (prosečno je protok bio oko 0,4 - 0,5 L u minuti). Kada je uzorak je propušten kroz filter, virusi su se eluirali sa staklene vune gravitacijom (20-30min) koristeći 200 ml 3% ekstrakt goveđeg mesa (*Beef extract powder, Sigma-Aldrich, B4888, Nemačka*) sa 0,05 M glicinskim puferom (*Glycine, Serva, Heidelberg, Nemačka*) čiji je pH 9,5. U baznoj sredini virusi se



odvajaju, vezuju za proteine i lakše spiraju sa filtera. Eluat se flokuliše (vezuje za krupnije proteinske partikule u rastvoru) dodavanjem 1N HCl sve dok pH ne dostigne vrednost 3,0-3,5. Flokulat se taložio centrifugiranjem na $7.000 \times g$ tokom 30 minuta (centrifuga *Eppendorf, model no.5804R*, Nemačka). Supernatant se odbacio a talog rastvori u PBS do krajnje zapremine koncentrisanog uzorka od 10 ml (tako je 10 L vode koncentrisano na zapreminu od 10 ml). Do ekstrakcije nukleinskih kiselina uzorak se čuvao na -70°C .

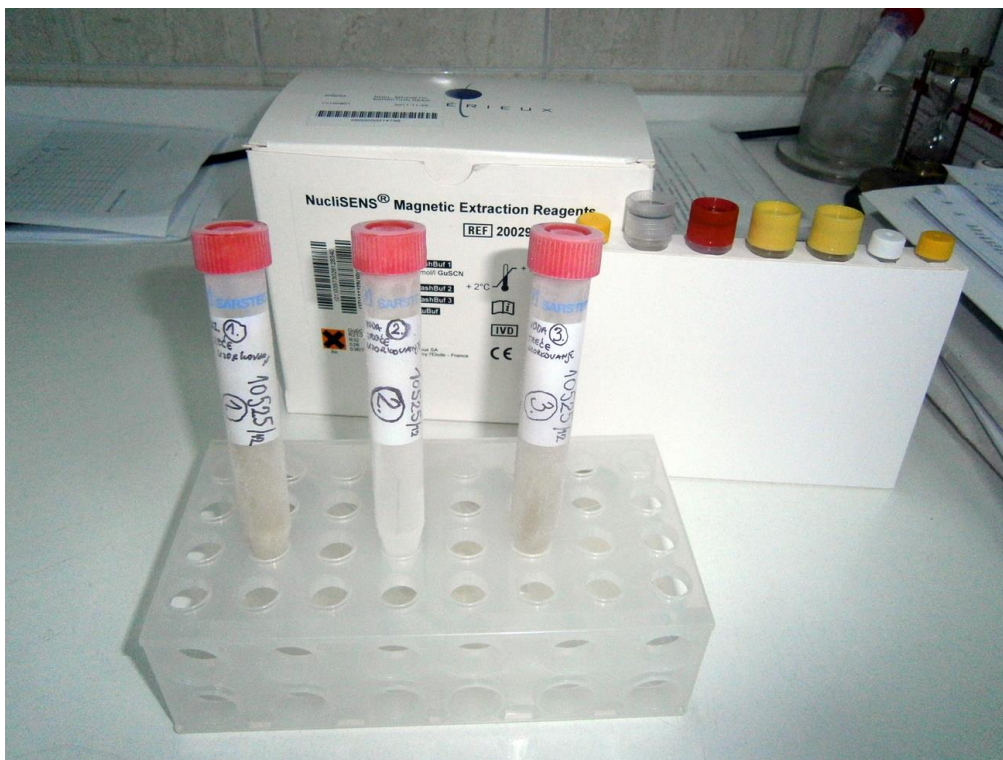


Slika 48. Koncentrovanje virusa iz uzorka vode



4.2.2 Ekstrakcija nukleinskih kiselina

Nukleinske kiseline (RNK i DNK) su izolovane iz 5 ml koncentrisanog uzorka upotrebom *NucliSENS[®]easiMAG* pufera za liziranje, 4x1000ml, proizvođača *bioMérieux*, Francuska i *NucliSens Magnetic Extraction Reagents* za ekstrakciju koji uključuju magnetne čestice, pufer za ispiranje (WB1, WB2, WB3) i pufer za eluciju, koji se nalaze u kitu proizvođača *bioMérieux*, Francuska. Nukleinske kiseline su izolovane u ukupnoj zapremini od 100 μ l ekstrahovanih nukleinskih kiselina (Sl.49). Postupak je izveden prema uputstvu proizvođača. Takođe, za ekstrakciju DNK i RNK je korišćena sledeća oprema: magnetni stalak za tube od 1,5 ml; centrifuge *Eppendorf* modeli 5415 i 5408, Nemačka; *Thermoshaker* (60°C/1.400 rpm) proizvođača *Vortemp Gyrator, UniEquip, GmbH*, Nemačka; *Cyclone Vortex Mixer*, proizvođača *Clifton Range, Nickel Electro Ltd*, Velika Britanija i biosigurnosni kabinet nivoa BSL2 (laminarna komora), proizvođača *Thermo Scientific[™]*, SAD.



Slika 49. Kit *NucliSENS MiniMag* i uzorci za ekstrakciju nukleinskih kiselina



4.2.3 Real-time PCR (qPCR) i real-time RT-PCR (RT-qPCR)

Uzorci površinskih i kanalizacionih voda su testirani na prisustvo sedam virusa: HAdV, NoV GI, NoV GII, HAV, HEV, PAdV i BPyV. Pored toga, utvrđivano je i prisustvo MNoV-1 dodatog u svaki od ispitivanih uzoraka vode, kako bi se procenila pouzdanost i uspešnost metode koncentrovanja virusa u uzorku vode i ekstrakcije nukleinskih kiselina. Prisustvo DNK virusa HAdV, PAdV i BPyV je testirano metodom real-time PCR (qPCR), a prisustvo RNK virusa NoV GI i GII, HEV, HAV i MNoV-1 je testirano real-time RT-PCR (RT-qPCR) metodom. Prajmeri i probe koji su se koristili u reakcijama su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri i probe za real-time (RT)-PCR

Virus	Naziv	Sekvenca	Pozicija u genomu	Referenca
HAdV	AdF	5'-CWTACATGCACATCKCSGG-3'	18868–18887	Hernroth i sar, 2002
	AdR	5'-CRCGGGCRAAYTGCACCAG-3'	18919–18938	
	AdP1	5'-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-BHQ-3'	18890–18917	
PAdV	PAdVF	5'-AACGGCCGCTACTGCAAG-3'	20701–20718	Hundesa i sar, 2009
	PAdVR	5'-AGCAGCAGGCTCTTGAGG-3'	20768–20751	
	PAdVP	5'-FAM-CACATCCAGGTGCCGC-BHQ1-3'	20722–20737	
BPyV	QB-F1-1	5'-CTAGATCCTACCCTCAAGGGAAT-3'	2122–2144	Hundesa i sar, 2010
	QB-R1-1	5'-TTACTTGGATCTGGACACCAAC-3'	2177–2198	
	QB-P1-2	5'-FAM-GACAAAGATGGTGTGTATCCTGTTGA -BHQ-3'	2149–2174	
NoV GI	QNIF4	5'-CGCTGGATGCGNTTCCAT-3'	5291–5308	da Silva i sar, 2007
	NV1LCR	5'-CCTTAGACGCCATCATCATTTAC-3'	5354–5376	
	NVGG1p	5'-FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-BHQ1-3'	5321–5340	
NoV GII	QNIF2	5'-ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA -3'	5012–5038	Loisy i sar, 2005
	CNG2R	5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'	5100–5080	
	QNIFS	5'-FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-BHQ1-3'	5042–5061	
HAV	HAV68	5'-TCACCGCCGTTTCC-3'	68–85	Costafreda i sar, 2006
	HAV240	5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAAG-3'	222–240	
	HAV150	5'-FAM-CCTGAACCTGCAGGAATTAA -MGB-NFQ-3'	150–169	
HEV	HEV-F	5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'	5311–5328	Jothikumar i sar, 2006
	HEV-R	5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'	5363–5380	
	HEV-P	5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ1-3'	5334–5351	
MNoV	FwORF1/2	5'-CACGCCACCGATCTGTTCTG-3'	4972–4991	Baert i sar, 2008
	RvORF1/2	5'-GCGCTGCGCCATCACTC-3'	5064–5080	
	ProbORF1/2	5'-FAM-CGCTTGGAAACAATG-MGB-NFQ-3'	5001–5015	

Prajmeri i proba za HAdV su specifični za konzervisani region prvog dela hekson gena HAdV koji kodira sintezu proteina kapsida virusa. Prajmeri u kombinaciji sa probom AdP1 su specifični za HAdV grupe A, C, D, E i F. Prajmeri i proba za PAdV su specifični za deo hekson



gena PAdV genoma koji kodira sintezu proteina kapsida virusa. Prajmeri i proba za BPyV su specifični za deo VP1 gena BPyV genoma koji takođe kodira sintezu proteina kapsida virusa. Za NoV korišćeni su specifični prajmeri i probe za genogrupe NoV GI (za deo genoma koji kodira kapsidni protein virusa) i NoV GII (deo genoma koji povezuje ORF1 i ORF2 delove genoma – „ORF1-ORF2 junction“). Za HEV su korišćeni prajmeri specifični za ORF 3 deo genoma koji se pokazao kao visoko konzervisan kod svih 4 genotipova HEV. Za HAV su korišćeni prajmeri za 5' nekodirajući region genoma virusa, dok su za MNoV korišćeni prajmeri specifični za ORF1/ORF2 deo genoma MNoV.

Amplifikacija (umnožavanje) delova nukleinskih kiselina i detekcija signala umnoženog specifičnog produkta je izvršena na instrumentu *7500 Real-time PCR system* proizvođača *Applied Biosystems, SAD (SL.50)*, koristeći PCR ploče sa 96 bazenčića (*Applied Biosystems, SAD*).



Slika 50. *Real-time PCR System*

Svaki uzorak je testiran u duplikatu u količini od 10 μ l i 5 μ l prethodno 10 puta razređenih ekstrakata nukleinskih kiselina. Razređivanje je vršeno iz razloga što se nerazređeni uzorci često ponašaju inhibitorno za PCR reakcije, zbog prisustva visoke koncentracije inhibitora. Za pozitivne kontrole korišćeni su DNK i RNK standardi konstruisani od strane *Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL)*, Španija i Martinez-Martinez i sar. (2011), a negativne kontrole (kontrola reagenasa bez uzorka – „no template control - NTC“ i kontrole



ekstrakcije) su uključene svaki put u postupku detekcije virusa kako bi potvrdile da je procedura bila ispravna. Za kontrolu inhibicije qPCR i RT-qPCR reakcije pri svakom testiranju je uključena interna kontrola amplifikacije (IAC) kao što je opisano od strane Diez-Valcarce i sar. (2011). Ako je u nekom uzorku postojala inhibicija reakcije, ekstrakt nukleinskih kiselina je dodatno razređen 10 puta i ponovo testiran. Samo uzorci koji su dali pozitivan IAC signal su uzeti u obzir, sa izuzetkom uzoraka koji su bili pozitivni na ciljni virus kada je signal za IAC mogao biti negativan.

Za detekciju DNK virusa (HAdV, PAdV a BPyV) korišćen je *TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD)* u ukupnoj zapremini od 25 μ l po reakciji. U qPCR za adenoviruse mešavina reakcije je sadržavala TaqMan Universal PCR Master Mix u količini od 12,5 μ M, 0.9 μ M oba prajmera i 0.225 μ M probe, 50 nM IAC probe, oko 100 kopija IAC DNK i 10 μ l ili 5 μ l nukleinske kiseline. Za BPyV 25 μ l reakcija je sadržavala TaqMan Universal PCR Master Mix (12,5 μ M), 0.4 μ M svakog prajmera, 0.12 μ M probe, 50 nM IAC probe, oko 300 kopija IAC DNK i 10 μ l ili 5 μ l nukleinske kiseline. Ukoliko je korišćeno 5 μ l nukleinske kiseline dodato je još 5 μ l H₂O po svakom uzorku.

U qPCR protokolu za HAdV i BPyV temperaturni ciklusi su bili sledeći: inaktivacija na 50°C tokom 2 minuta, aktivacija *AmpliTaQ Gold polymerase (Applied Biosystems, SAD)* na 95°C tokom 10 minuta i 50 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju na 95°C tokom 15 sekundi i vezivanje prajmera/izduživanje lanca DNK na 60°C tokom 1 minut. Temperaturni ciklusi za PAdV se razlikuju u fazama vezivanja i izduživanja lanca koji su u ovom slučaju 55°C tokom 20 sekundi i 60°C tokom 40 sekundi.

RNK virusi su detektovani korišćenjem *RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, SAD)* za reakciju u ukupnoj zapremini od 20 μ l. Protokol RT-qPCR za RNK viruse je sadržavao *RNA Ultrasense reaction mix* u količini od 10 μ l, prajmere i probe (0.5 μ M *forward*, 0.9 μ M *reverse* prajmer i 0.25 μ M probe za NoV GI, NoV GII i HAV; 0.25 μ M po svakom prajmeru i 0.1 μ M probe za HEV; i 0.2 μ M svakog prajmera i probe za MNoV-1, 50 nM IAC probe, 300 kopija IAC RNA, 1 \times ROX *reference dye*, i 5 μ l ili 10 μ l nukleinske kiseline. Protokol RT-qPCR za RNK viruse je podrazumevao sledeće temperaturne cikluse: reverznu transkripciju na 50°C tokom 15 minuta, denaturaciju na 95°C tokom 2 minuta i 50 ciklusa koji uključuju denaturaciju na 95°C tokom 15 sekundi i anilinga/ekstenzije na 60°C tokom 1 minut. Razlika kod HEV je u fazi anilinga na 55°C tokom 20 sekundi i ekstenzije na 72°C tokom 40 sekundi.



4.2.4 Lančana reakcija polimeraze (PCR), RT-PCR i nested PCR

Neki pozitivni uzorci koji su detektovani na real-time (RT)-PCR su uradjeni i metodama PCR, RT-PCR i nested PCR radi dobijanja produkta za sekvenciranje, potvrdu i tipizaciju detektovanog virusa. Prajmeri korišćeni za PCR, RT-PCR i nested PCR su prikazani u Tabeli 4. Prajmeri za HAdV su za deo hekson gena koji kodira sintezu proteina kapsida virusa i specifični su za tipove: A: 12, 18, 31; B: 3, 7, 11, 14, 21, 34, 35; C: 1, 6, D: 8, 9, 10, 13, 19, 19a, 37, 44; E: 4 i F: 40, 41. Prajmeri za PAdV i BPyV su specifični za delove hekson regiona genoma PAdV i BPyV koji kodiraju proteine kapsidnog omotača pomenutih virusa. Prajmeri za NoV su univerzalni za sve genogrupe virusa i umnožavaju deo genoma koji kodira sintezu RNK zavisne RNK polimeraze. Prajmeri za HEV su specifični za ORF1 i ORF2 delove genoma HEV.

Tabela 4. Prajmeri za PCR, RT-PCR i nested PCR

Virus	Naziv	Sekvenca	Pozicija u genomu	Očekivani produkt (bp)	Referenca	
HAdV	hex1deg	5'-GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC-3'	18858–18883	301	Allard i sar, 2001	
	hex2deg	5'-CAGCACSCCICGRATGTCAAA-3'	19136–19158			
	nehex3deg	5'-GCCCGYGCMAICIGAIACSTACTTC-3'	18931–18954	171		
	nehex4deg	5'-CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA-3'	19077–19102			
PAdV	PALF	5'-GATGTCATGGAYAACGTCAAC-3'	20627–20647	612	Maluquer de Motes i sar, 2004	
	PARF	5'-CACGGAGGAGTCRAACTGGATG-3'	21217–21238			
	PALN	5'-TACTGCMAGTTYCACATCCAGGT-3'	20711–20733	344		
	PARN	5'-GGAATGGAGATGGGCAGGTT-3'	21035–21054			
BPyV	VP1F	5'-GGTATTCGCCCTCTGCTGGTCAAG-3'	11940–1963	527	Hundesa i sar, 2006	
	VP1R	5'-GCTGGCAATGGGGTATGGGTCT-3'	12466–2444			
	VP2F	5'-ATTTCAAAGCCCCCTATCATC-3'	12048–2068	263		
	VP2R	5'-GCCTACGCCATTCTCATCAAG-3'	12310–2290			
NoV	JV12Y	5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3'	4552-4572	327	Rutjes i sar, 2006	
	JV13I	5'-TCATCATCACCATAGAAIGAG-3'	4878-4858			
HEV	ORF1-s1	5'-CTGGCATYACTACTGICYATTGAGC-3'	56-79	418	van der Poel i sar, 2001	
	ORF1-a1	5'-CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC-3'	451-473			
	ORF1-s2	5'-CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG-3'	104-124	286		
	ORF1-a2	5'-GGCAGWRTACCARCCTGAACATC-3'	367-389			
HEV	3156-EF	5'-AAYTATGCMCAGTACCGGTTG-3'	5687-5708	738	van der Poel i sar, 2001	
	3157-ER	5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3'	6395-6417			
	ORF2	3158-EF	5'-GTYATGTYTYTGCATACATGGCT-3'	5972-5993		348
	3159-IRS	5'-AGCCGACGAAATYAATTCTGTC-3'	6298-6319			

Za detekciju DNK virusa (HAdV, PAdV i BPyV) na agaroznom gelu za nested PCR korišćen je *HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Nemačka)* u reakciji ukupne zapremine od 25 µl.



Nested PCR za adenoviruse i poliomavirus goveda je sadržavao *HotStarTaq Master Mix* (*HotStarTaq DNA Polymerase, PCR Buffer* sa 3 mM MgCl₂ i 400 μM za svaki dNTP) u količini od 12,5 μl i 50 μM odgovarajućih parova prajmera (Tab.4) za oba koraka nested PCR (klasičan PCR i nested PCR).

Količina uzorka DNK je iznosila 5 μl u reakciji prvog koraka PCR, a 1,5 μl uzorka produkta PCR reakcije za nested PCR. Uzorci DNK za PCR reakciju su korišćeni koncentrovano (k) i/ili u razređenju 10⁻¹(r). Prvi korak PCR protokola za HAdV podrazumeva sledeće temperaturne cikluse: inaktivaciju i inicijalnu denaturaciju na 95⁰C tokom 15 minuta i 45 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju na 95⁰C tokom 30 sekundi, aniling na 55⁰C tokom 30 sekundi, ekstenziju lanca na 72⁰C tokom 1 minut, kao i konačno izduživanje lanca na 72⁰C tokom 10 minuta. Za klasičan PCR korišćeni su prajmeri hex1deg i hex2deg (Tab.3). Drugi korak - nested PCR za humane adenoviruse je rađen po istom protokolu i na istim temperaturnim ciklusima koristeći prajmere za nested PCR (nehex3deg i nehexasdeg) (Tab.3). U reakciji su korišćene negativna kontrola (NTC) i pozitivna kontrola za humane adenoviruse (ASTD). Za PCR i nested PCR korišćen je instrument *Mastercycler gradient*, (*Eppendorf*, Nemačka).

Protokol PCR za PAdV podrazumevao je sledeće temperaturne cikluse: denaturaciju na 95⁰C tokom 15 minuta, 40 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju na 94⁰C tokom 1minut, aniling na 54⁰C tokom 1 minut i ekstenziju lanca na 72⁰C tokom 75 sekundi, kao i konačnu ekstenziju lanaca na 72⁰C tokom 7 minuta. Drugi korak nested PCR za PAdV se razlikuje u odnosu na protokol za HAdV u temperaturi anilinga koja je iznosila 57⁰C tokom 1 minut, i dužini trajanja ekstenzije koja je iznosila 72⁰C tokom 1 minut. Mešavina PCR i nested PCR reakcije za PAdV je bila ista kao i za HAdV, sa tim da su korišćeni prajmeri: PALF i PARF za klasičan PCR, kao i PALN i PARN za nested PCR (Tab. 3). U reakcijama PCR i nested PCR su korišćene negativna kontrola (NTC) i pozitivna kontrola za PAdV (uzorak koji je imao pozitivan nalaz na qPCR - 6096/3r i koji je sekvenciran i deponovan u GenBank).

Nested PCR protokol za BPyV je podrazumevao iste temperaturne cikluse u oba koraka: denaturaciju na 95⁰C tokom 15 minuta, 40 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju na 95⁰C tokom 1 minut, aniling na 58⁰C tokom 75 sekundi, ekstenziju lanca na 72⁰C tokom 75 sekundi, kao i konačnu ekstenziju na 72⁰C tokom 7 minuta. Mešavina PCR i nested PCR reakcije za BPyV je bila ista kao i za HAdV, sa tim da su korišćeni prajmeri: VP1F i VP1R za klasičan PCR, kao i VP2F i VP2R za nested PCR (Tab. 3). U reakcijama PCR i nested PCR su



korišćene negativna kontrola (NTC) i pozitivna kontrola za BPyV (uzorak koji je imao pozitivan nalaz na qPCR - 8424/2r i koji je sekvenciran i deponovan u GenBank).

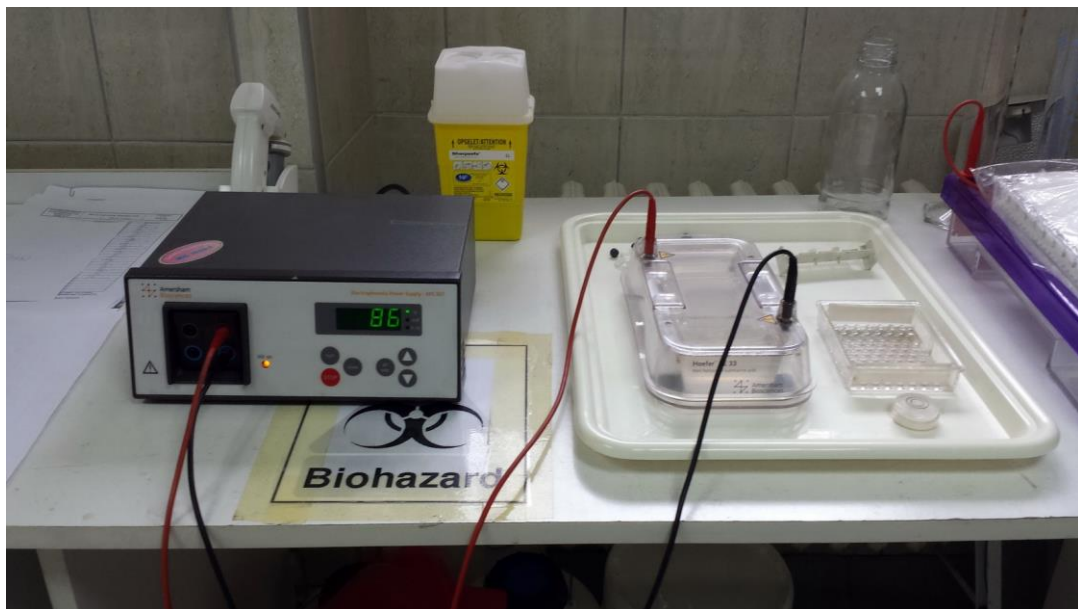
Za RT-PCR detekciju HEV na agaroznom gelu za HEV ORF1 i ORF2 delove genoma, korišćen je *OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Nemačka)* u ukupnoj zapremini reakcije od 25 μ l. *OneStep RT-PCR Kit* sadrži *5xOneStep RT-PCR Buffer* u količini od 5 μ l, *dNTP Mix* 10mM u količini od 1 μ l, *RTPCR Enzyme Mix* u količini od 1 μ l, oba prajmera po 250 μ M, uzorka 5 μ l i ddH₂O do 25 μ l. Za reakciju RT-PCR za HEV korišćeni su prajmeri navedeni u Tabeli 3. U reakcijama RT-PCR i nested PCR su korišćene negativna kontrola (NTC) i pozitivne kontrole za ORF1 i ORF2 delove genoma HEV (RNK poreklom od uzorka žuči domaćih svinja iz klanice u Novom Sadu, označene brojevima 52 i 174, koje su sekvencirane i postupak deponovanja u GenBank je u toku). Količina uzorka RNK je iznosila 5 μ l u reakciji prvog koraka RT-PCR, a 1,5 μ l uzorka produkta RT-PCR reakcije za nested PCR. Uzorci RNK za RT-PCR reakciju su korišćeni koncentrovano (k) i/ili u razređenju 10⁻¹(r). Protokol RT-PCR za HEV podrazumeva izvođenje obe reakcije: reverznu transkripciju na 50°C tokom 30 minuta, inaktivaciju reverzne transkriptaze, aktivaciju DNK polimeraze i inicijalnu denaturaciju na 95°C tokom 15 minuta i 40 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju na 94°C tokom 1 minut, aniling na 55°C tokom 1 minut, ekstenziju lanaca na 72°C tokom 1 minut i konačnu ekstenziju na 72°C tokom 10 minuta. Nested PCR za detekciju HEV ORF1 i ORF2 delova genoma je rađen sa *HotStarTaq Master Mix Kit-om (Qiagen, Nemačka)* u ukupnoj zapremini reakcije od 25 μ l. Nested PCR protokol za HEV podrazumeva sledeće temperaturne cikluse: denaturaciju na 95°C tokom 15 minuta, 40 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju na 94°C tokom 1 minut, aniling na 55°C tokom 1 minut, ekstenziju lanca na 72°C tokom 1 minut, kao i konačnu ekstenziju na 72°C tokom 10 minuta.

Za detekciju NoV na agaroznom gelu za RT-PCR korišćen je *OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Nemačka)* u ukupnoj zapremini reakcije od 25 μ l i reakcionom miksu kako je navedeno i za HEV, sa tim da su u ovoj reakciji korišćeni oligonukleotidni prajmeri za NoV (JV12Y i JV12I) (Tab.3). U reakciji su korišćene negativna kontrola (NTC) i 2 pozitivne kontrole za NoV su dobijene ljubaznošću kolega sa odeljenja za virusologiju Instituta za javno zdravlje u Novom Sadu koje su označene brojevima 1 i 2 (RNK NoV kontrola potiču iz uzoraka stolice 2 pacijenata u Novom Sadu). Količina uzorka RNK je iznosila 5 μ l u reakciji RT-PCR. Uzorci RNK za RT-PCR reakciju su korišćeni koncentrovano (k) i/ili u razređenju 10⁻¹(r). Protokol RT-PCR za NoV podrazumeva sledeće temperaturne cikluse: reverznu transkripciju na 50°C tokom



30 minuta, inaktivaciju reverzne transkriptaze, aktivaciju DNK polimeraze i inicijalnu denaturaciju na 95⁰C tokom 15 minuta i 40 ciklusa umnožavanja koji uključuju denaturaciju na 94⁰C tokom 1 minut, aniling na 40⁰C tokom 1 minut, ekstenziju lanaca na 72⁰C tokom 1 minut, kao i konačnu ekstenziju na 72⁰C tokom 10 minuta.

Elektroforeza je izvršena na 1,5% agaroznom gelu (*TopVision Agarose*, Thermo Scientific, SAD), u instrumentu *Hoefer HE33, Mini Horizontal Submarine Unit*, sa električnim napajanjem za elektroforezu *Electrophoresis Power Supply EPS 301* (*Amersham Bioscience*, SAD) (SI.51) pri naponu 100 V tokom 45 min, na sobnoj temperaturi. Korišćen je pufer *Tris-acetate-EDTA buffer (TAE) 50x* (*Thermo Scientific*, SAD) sa dodatkom *Ethidium bromide solution (EtBr)*, 10mg u H₂O, (*Sigma-Aldrich*, SAD).



Slika 51. Elektroforeza

Vizuelizacija DNK na gelovima je izvršena upotrebom UV svetla u instrumentu *GelDoc - It2 Imager*, *UVP LLC*, (An Analytik Jena Company, Nemačka) (SI.52) i gelovi su dokumentovani. Za svaku vizuelizaciju na gelovima korišćeni su komercijalni markeri sa smešom DNK različite veličine, sa osnovnom razlikom u veličini fragmenata DNK od 100 baznih parova (marker 100 bp), da bi odredili veličinu fragmenata, kao i odgovarajuće negativne i pozitivne kontrole za svaki virus.



Slika 52. GelDoc-It² Imager

4.2.5 Sekvenciranje

Nakon dobijanja pozitivnog rezultata na agaroznom gelu, vršen je postupak isecanja produkta sa gela, prečišćavanja produkta i sekvenciranje. Prečišćavanje DNK sa agaroznog gela je uobičajena tehnika za izolaciju specifičnih fragmenata iz reakcione smeše i izvršeno je komercijalnim kitom *Gel Extraction Kit, peqGOLD*, (PEQLAB, Erlangen, Nemačka), prema uputstvu proizvođača.

Odredjeni broj uzoraka koji su reagovali pozitivno na prisustvo adenovirusa ljudi i svinja, norovirusa GI i GII, hepatitis E virusa i poliomavirusa goveda, a sve u cilju potvrde uspešnosti detekcije virusa u ispitivanim površinskim vodama, su pripremljeni za sekvenciranje po uputstvu laboratorije angažovane za sekvenciranje (*Macrogen*, Holandija). Uzorci su sekvencirani u dužini jednog dela genoma metodom po Sangeru na instrumentu *ABI 3730XL* u laboratoriji *Macrogen Europe*, Holandija. Za sekvenciranje su upotrebljeni isti prajmeri koji su korišćeni za PCR, RT-PCR i nested PCR (Tab.4).

Dobijene nukleotidne sekvence analizirane su u programu „*FinchTV*“ („*Geospiza, Inc.*“) a potom upoređene sa ostalim sekvencama dokumentovanim u „*GenBank*“ bazi podataka („*NCBI (National Center for biotechnology Information, Nacional Institutes)*“) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Upoređivanje (engl. *alignment*) dobijenih sekvenci je izvršeno upotrebom *online* alata BLASTn (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*).



Višestruko poravnanje sekvenci metodom ClustalW je izvršeno u programskom paketu MEGA 6.0, a potom je u istom konstruisano filogenetsko stablo metodom „*Maximum Likelihood*“ baziranom na modelu „*Kimura 2-parameter*“ sa „*Bootstrap*“ vrednošću od 1000 ponavljanja (Kimura, 1980; Tamura i sar, 2004; Tamura i sar, 2013; Tamura i sar, 2014). Sekvence su prijavljene u GenBank pod odgovarajućim brojevima (Tab.15 u prilogu).

4.2.6 Statistička obrada podataka

Kvantifikacija pozitivnih reakcija je izvršena izračunavanjem najverovatnijeg broja PCR detektabilnih jedinica u 1L vode, sa intervalom pouzdanosti 95%, kao što su opisali Kokkinos i sar. (2012) i Maunula i sar. (2013). Ekstrahovana nukleinska kiselina je testirana u razblaženju 10^{-1} u količinama 10 μ L i 5 μ L. Za svaku količinu su urađena 2 ponavljanja i dva izračunavanja. Ako su oba ponavljanja proizvela pozitivan signal, kasnije razblaženja su testirana sve do momenta kada su oba ponavljanja jednog razblaženja bili negativni.

Prinos, tj. *recovery* vrednost (procenat prinosa ispitivane karakteristike) se u ovom slučaju procenjivao i izračunavao iz razlike u količini dodate i detektovane procesne kontrole (Murine norovirusa - MNoV) po uzorku nakon celokupnog postupka obrade i detekcije. Pre postupka koncentrovanja virusa u svaki ispitujući uzorak vode je dodata procesna kontrola (10 μ l MNoV titra $10^6/10$ L uzorka vode) a zatim je nakon postupka detekcije za svaki ispitivani uzorak izračunata njegova količina u uzorku nakon procesa koncentrovanja virusa u uzorku vode i ekstrakcije nukleinske kiseline iz uzorka. Dobijena vrednost je upoređena sa količinom MNoV koja je dodata uzorku kao standard (kvantitativni RT-qPCR), odnosno izračunat je procenat prinosa (koliko je detektovano čestica MNoV u odnosu na broj čestica virusa koji je stavljen u uzorak pre obrade). Takođe, prinos se može proceniti na osnovu razlike između broja genomskih kopija MNoV u uzorku i nakon koncentrovanja virusa i ekstrakcije nukleinskih kiselina.



5 REZULTATI



5.1 Rezultati utvrđivanja prisustva virusa real-time PCR i real-time RT-PCR metodama

Od oktobra 2012. do juna 2014. godine ukupno je uzorkovano 108 uzoraka površinskih voda i gradske kanalizacione vode, koji su tretirani i koncentrovani opisanim metodama, nakon čega je izvršena analiza prisustva sedam odabranih virusa. Rezultati analize real-time (RT) PCR su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Podaci o uzorcima i rezultati prisustva odabranih virusa detektovanih real-time (RT) PCR metodom

R.br.	Lokalitet	Vreme uzorkovanja	Br.naloga za ispitivanje	NoV GI	NoV GII	HAdV	PAdV	HEV	HAV	BPyV
1	Dunav GC-1 Novi Sad	10.2012.	9431/1	-	+	+	-	-	-	-
		11.2012.	9978/1	-	+	+	+	-	-	-
		12.2012.	10525/1	-	+	+	-	+	-	-
		09.2013.	7405/1	+	+	+	-	-	-	-
		11.2013.	9605/1	-	+	+	-	-	-	-
		06.2014.	6096/1	+	+	+	+	-	-	+
2	Dunav GC-2 Novi Sad	10.2012.	9431/3	+	+	+	-	-	-	-
		09.2013.	7405/2	+	+	+	-	-	-	-
		12.2012.	10525/3	-	+	+	+	-	-	-
		11.2012.	9978/3	-	+	+	-	-	-	-
		11.2013.	9605/2	+	+	+	-	-	-	-
		06.2014.	6096/2	+	+	+	+	-	-	+
3	Dunav, plaža Oficirac, Novi Sad	10.2012.	9431/2	-	+	+	-	-	-	-
		11.2012.	9978/2	-	-	+	-	-	-	-
		12.2012.	10525/2	-	+	-	-	-	-	-
		09.2013.	7405/3	-	+	+	-	-	-	-
		11.2013.	9605/3	-	+	+	-	-	-	-
		06.2014.	6096/3	+	-	-	+	-	-	+
4	Dunav-štrand 1, Novi Sad	07.2013.	5401/1	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013.	8424/1	-	+	+	-	-	-	+
		03.2014.	2402/1	+	-	-	-	-	-	-
5	Dunav-štrand 2, Novi Sad	07.2013.	5401/2	+	-	-	-	-	-	-
		11.2013.	8424/2	-	-	+	-	-	-	+
		03.2014.	2402/2	-	-	-	-	-	-	-
6	Dunav, Plavna	10.2013.	9498/1	-	-	-	-	-	-	-
		12.2013.	9996/2	-	-	-	-	-	-	-
		06.2014.	6168/2	-	-	-	-	-	-	-
7	Dunav, Karađorđevo	10.2013.	9498/2	-	-	-	-	-	-	-
		12.2013.	9996/1	-	-	+	-	-	-	-
		06.2014.	6168/1	-	-	-	-	-	-	-
8	Dunav, Pančevo	10.2013.	9267/1	-	+	+	-	-	-	-
		12.2013.	10452/1	-	+	-	-	-	-	-
		03.2014.	2843/1	-	-	+	+	-	-	-
9	Krivaja, Srbobran, pored farme goveda	06.2013.	4422/1	-	-	-	+	-	-	-
		11.2013	9144/1	-	+	+	-	-	-	-
		05.2014.	4114/1	-	-	-	-	-	-	-
10	Krivaja, Srbobran, između dve farme	06.2013.	4422/2	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013	9144/2	-	+	+	-	-	-	-
		05.2014.	4114/2	-	-	-	-	-	-	-
11	Krivaja, Srbobran, farma 1	06.2013.	4422/3	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013	9144/3	-	-	-	-	-	-	-
		05.2014.	4114/3	-	-	-	-	-	-	-
12	Krivaja, Radičević, farma 2	06.2013.	4978/1	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013	9144/4	-	-	-	-	-	-	+
		05.2014.	4114/5	-	-	-	-	-	-	-



13	Krivaja, Radičević-farma 3	06.2013.	4978/2	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013	9144/5	-	-	+	-	-	-	-
		05.2014.	4114/4	-	-	-	-	-	-	-
14	Mostonga, DTD kanal, posle TP, Sombor	10.2013.	8745/1	-	+	+	-	-	-	-
		12.2013.	10960/3	-	-	+	-	-	-	-
		03.2014.	2621/3	-	+	+	-	-	-	-
15	DTD kanal, Sombor	10.2013.	8745/2	-	-	-	-	-	-	-
		12.2013.	10960/1	-	-	-	-	-	-	-
		03.2014.	2621/1	-	-	-	-	-	-	-
16	DTD kanal, Odžaci	10.2013.	8745/3	-	-	+	+	-	-	-
		12.2013.	10960/2	-	-	+	-	-	-	-
		03.2014.	2621/2	-	-	-	-	-	-	-
17	DTD-Bački Petrovac	09.2013.	7256/1	-	-	-	-	-	-	-
		10.2013.	8633/2	-	-	-	-	-	-	-
		03.2014.	2621/4	+	+	-	-	-	-	-
18	DTD kanal, Melenci-Bašaid	07.2013.	5677/1	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013.	9547/1	-	-	-	-	-	-	-
		06.2014.	6358/1	-	-	-	-	-	-	-
19	DTD kanal, Kikinda	07.2013.	5677/2	-	+	-	+	-	-	-
		11.2013.	9547/3	-	-	-	-	-	-	-
		06.2014.	6358/2	-	-	-	-	-	-	-
20	Paličko jezero, posle TP	10.2013.	8454/1	-	+	+	-	-	-	-
		12.2013.	11523/1	-	+	+	-	-	-	-
		03.2014.	2401/3	+	+	+	-	-	-	-
21	Paličko jezero, plaža	10.2013.	8454/2	-	-	-	-	-	-	-
		12.2013.	11523/2	-	-	-	-	-	-	-
		03.2014.	2401/1	-	-	-	-	-	-	-
22	Stara Tisa, Čurug,plaža	07.2013.	6227/1	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013.	8633/4	-	-	-	-	-	-	-
		04.2014.	3364/2	-	-	-	-	-	-	-
23	Jegrička, Žabalj	07.2013.	6227/2	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013.	8633/3	-	-	-	-	-	-	-
		04.2014.	3364/1	-	-	-	-	-	-	-
24	Begej, Zrenjanin	10.2013.	8633/1	-	+	+	-	-	-	-
		11.2013.	9547/2	-	-	-	+	-	-	-
		04.2014.	3364/3	-	+	-	-	-	-	-
25	Obedska bara, Obrež	10.2013.	8921/1	-	-	-	-	-	-	-
		11.2013.	9995/1	-	-	-	-	-	-	-
		06.2014.	6431/1	-	-	-	-	-	-	-
26	Sava, Sr. Mitrovica, plaža	10.2013.	8921/2	+	+	+	-	-	-	+
		11.2013.	9995/2	-	-	+	+	-	-	-
		06.2014.	6431/2	-	-	-	-	-	-	-
27	Sava, Sr. Mitrovica, izliv kanalizacije	10.2013.	8921/3	-	+	+	-	+	-	-
		11.2013.	9995/3	-	+	+	-	-	-	-
		06.2014.	6431/3	-	-	+	-	-	-	-
28	Rakovački potok, Rakovac	10.2013.	9420/1	-	+	-	-	-	-	-
		12.2013.	10166/1	-	-	-	-	-	-	-
		03.2014.	2402/3	-	-	-	-	-	-	-
29	Veliki bački kanal, Vrbas	10.2013.	9664/1	+	+	+	-	-	-	-
		12.2013.	10708/1	-	+	-	-	-	-	-
		04.2014.	3029/1	+	+	+	-	-	-	-
30	KCIII kanal, Vrbas	10.2013.	9664/2	-	+	+	-	+	-	-
		12.2013.	10708/2	-	+	-	-	-	-	-
		04.2014.	3029/2	+	+	+	-	-	-	-
31	Influent gradske kanalizacije, Sombor	10.2013.	8745/4	-	+	-	-	-	-	-
		12.2013.	10960/5	-	-	-	-	-	-	-
		03.2014.	2621/6	-	+	-	-	-	-	+
32	Gradska kanalizaciona voda, Odžaci	10.2013.	8745/5	-	+	+	-	-	-	-
		12.2013.	10960/4	+	+	-	-	-	-	-
		03.2014.	2621/7	+	-	-	-	-	-	-
33	Influent gradske kanalizacije, Palić, Subotica	10.2013.	8454/3	-	+	+	-	-	-	-
		12.2013.	11523/3	-	+	+	-	-	-	-
		03.2014.	2401/2	-	-	+	-	-	-	-



5.1.1 Prisustvo humanih adenovirusa

Najčešći virus koji je detektovan u ovom istraživanju je humani adenovirus. Prisustvo HAdV je utvrđeno u 42,4% (42/99) uzoraka površinskih voda na 60,0% (18/30) testiranih lokaliteta, u 66,7% (8/12) ispitanih površinskih voda (Dunav, Sava, Begej i Krivaja, kao i DTD, Veliki bački, KCIII kanali i Palić). Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode u 44,4% (4/9) je detektovan HAdV (Tab.6).

Tabela 6. Rezultati utvrđivanja prisustva HAdV metodom real-time PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja

HAdV Lokalitet	2012			2013				2013			2014			
	X	XI	XII	VI	VII	IX	X	XI	XII	III	IV	V	VI	
1. Dunav - GC-1 Novi Sad	+	+	+	/	/	/	+	/	+	/	/	/	+	
2. Dunav - GC-2 Novi Sad	+	+	+	/	/	/	+	/	+	/	/	/	+	
3. Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	+	+	-	/	/	/	+	/	+	/	/	/	-	
4. Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	/	/	/	/	/	-	/	/	+	/	-	/	/	
5. Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	/	/	/	/	/	-	/	/	+	/	-	/	/	
6. Dunav - Plavna	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-	
7. Dunav - Karađorđevo	/	/	/	/	/	/	-	/	+	/	/	/	-	
8. Dunav - Pančevo	/	/	/	/	/	/	/	+	/	-	+	/	/	
9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda	/	/	/	-	/	/	/	+	/	/	/	/	-	
10. Krivaja - Srbobran - između 2 farme	/	/	/	-	/	/	/	+	/	/	/	/	-	
11. Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-	
12. Krivaja - Radičević - farma svinja 2	/	/	/	-	/	/	/	+	/	/	/	/	-	
13. Krivaja - Radičević - farma 3	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-	
14. Mostonga, DTD kanal - posle TP	/	/	/	/	/	/	/	+	/	+	+	/	/	
15. DTD kanal - Sombor	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	
16. DTD kanal - Odžaci	/	/	/	/	/	/	/	+	/	+	-	/	/	
17. DTD kanal - Bački Petrovac	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/	
18. DTD kanal - Melenci-Bašaid	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-	
19. DTD kanal - Kikinda	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-	
20. Paličko jezero - posle TP	/	/	/	/	/	/	/	+	/	+	+	/	/	
21. Paličko jezero- plaža	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	
22. Tisa - Čurug - plaža	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	
23. Jegrička - Žabalj	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	
24. Begej - Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	/	+	-	/	/	-	/	
25. Obedska bara - Obrež	/	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	-	
26. Sava - Sr. Mitrovica-plaža	/	/	/	/	/	/	/	+	+	/	/	/	-	
27. Sava - Sr. Mitrovica	/	/	/	/	/	/	/	+	+	/	/	/	+	
28. Rakovački potok - Rakovac	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	
29. Veliki bački kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	/	+	/	-	/	+	/	
30. KCIII kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	/	+	/	-	/	+	/	
31. Gradska kanalizacija Sombor	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	
32. Gradska kanalizacija Odzaci	/	/	/	/	/	/	/	+	/	-	-	/	/	
33. Gradska kanalizacija Subotica, Palić	/	/	/	/	/	/	/	+	/	+	+	/	/	

Legenda: 1-30-Lokaliteti uzorkovanih površinskih voda; 31-33-Lokaliteti uzoraka gradske kanalizacione vode; III-XII -Meseci tokom kojih je vršeno uzorkovanje; „+“ pozitivni uzorci; „-“ negativni uzorci; „/“ nisu ispitivani uzorci; TP-tretman prečišćavanja



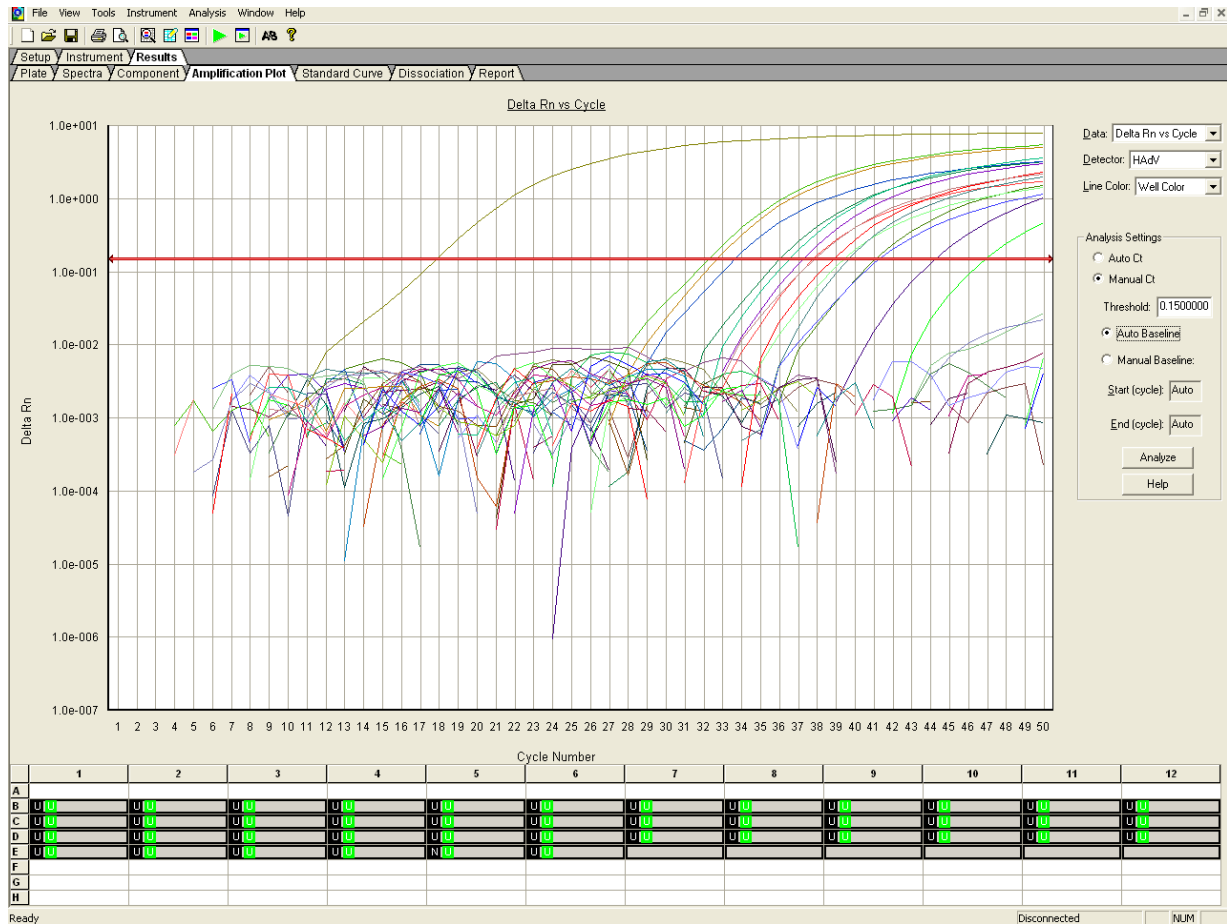
Tokom zime 2012. godine HAdV je detektovan u 88,9% (8/9) uzoraka reke Dunav na tri lokaliteta u Novom Sadu. U toku sezone leto 2013. godine HAdV je detektovan u 40,0% (12/30) uzoraka površinske vode i 66,7% (2/3) uzorka influenta gradske kanalizacije. Tokom sezone jesen/zima 2013. godine HAdV je detektovan u 46,7% (14/30) uzoraka površinske vode i 33,3% (1/3) uzorka influenta gradske kanalizacije. Na proleće 2014. godine HAdV je detektovan u 26,7% (8/30) uzoraka površinske vode i 33,3% (1/3) uzorka influenta gradske kanalizacije. U Subotici, na prečistaču gradske kanalizacije, uzorci influenta i efluenta su bili pozitivni u sva tri uzorkovanja tokom 3 različite sezone uzorkovanja. U Somboru, uzorci influenta su bili negativni u sva tri uzorkovanja a efluent je bio pozitivan. U Odžacima je uzorak kanalizacione vode bio pozitivan samo u periodu uzorkovanja leto 2013. godine dok je DTD kanal u koji se uliva kanalizaciona voda bio pozitivan u obe sezone uzorkovanja tokom 2013. godine.

U ispitanim uzorcima površinskih voda koje se koriste za rekreaciju, a koje su uzorkovane na mestima javnih kupališta (lokaliteti br. 3, 4, 5, 21, 22 i 26), u 38,1% (8/21) je utvrđeno prisustvo humanog adenovirusa (lokaliteti br. 3, 4, 5 i 26) (Tab.6).

U ispitanim uzorcima površinskih voda koje su pod uticajem izliva kanalizacije bez tretmana prečišćavanja i koje su uzorkovane nizvodno od izliva kanalizacije (lokaliteti pod brojem: 1, 2, 8, 16, 19, 24, 27 i 30) u 73,3% (22/30) je utvrđeno prisustvo humanog adenovirusa. Od 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, prisustvo HAdV je utvrđeno u samo jednom uzorku. U parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, kao i u SRP Obedska bara nije detektovan humani adenovirus. Od 15 uzoraka u blizini farmi prisustvo HAdV je utvrđeno u 3 (20,0%) uzorka (Tab.6).

Humani adenovirus nije detektovan na 12 od 30 (40,0%) lokaliteta površinskih voda. U pitanju su lokaliteti: Dunav u mestu Plavna, Krivaja u Srbobranu i blizini mesta Bečej, DTD kanal u Somboru, Bačkom Petrovcu, između Melenaca i Bašaida i u Kikindi, plaža na Palićkom jezeru, Tisa u Čurugu, Jegrička u Žablju, Obedska bara i Rakovački potok. Takođe, HAdV nije detektovan na jednom od 3 (33,3%) lokaliteta gradske kanalizacione vode (influent u Somboru) (Tab.6).

Na slici 53. su prikazani neki od rezultata utvrđivanja prisustva humanog adenovirusa metodom real-time PCR.



Slika 53. Detekcija HAdV u uzorcima vode metodom real-time PCR

5.1.2 Prisustvo norovirusa genogrupe II

Norovirus genogrupe II (NoV GII) je detektovan u 40,4% (40/99) uzoraka na 56,7% (17/30) lokaliteta i u 75,0% (9/12) ispitivanih površinskih voda (reke Dunav, Sava, Begej i Krivaja, kao i DTD, Veliki bački, KCIII kanali, jezero Palić, i Rakovački potok). Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode u 66,7% (6/9) je detektovan NoV GII (Tab.7).

Tokom zime 2012. godine NoV GII je detektovan u 88,9% (8/9) uzoraka reke Dunav na tri lokaliteta u Novom Sadu. U sezoni leto 2013. godine ovaj virus je detektovan u 43,3% (13/30) uzoraka površinske vode i u sva tri uzorka influenta gradske kanalizacije. U periodu uzorkovanja jesen/zima 2013. godine NoV GII je detektovan u 36,7% (11/30) uzoraka površinske vode i 66,7% (2/3) uzoraka influenta gradske kanalizacije. Na proleće 2014. godine NoV GII je detektovan u 26,7% (8/30) uzoraka površinske vode i 33,3% (1/3) uzoraka influenta gradske kanalizacije. Influenti gradske kanalizacije u Somboru, Subotici i gradska



kanalizaciona voda u Odžacima su bili pozitivni u 2 od 3 uzorkovanja. Efluent u Somboru je bio pozitivan u dve sezone uzorkovanja. U Subotici su uzorci nakon tretmana prečišćavanja bili pozitivni u sve tri sezone uzorkovanja, dok je u Odžacima, recipijent DTD kanal nakon ulivanja kanalizacione vode bio negativan u sve tri sezone uzorkovanja.

Tabela 7. Rezultati utvrđivanja prisustva NoV GII metodom real-time RT-PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja

NoV GII Lokalitet	2012			2013				2013				2014			
	X	XI	XII	VI	VII	IX	X	XI	XII	III	IV	V	VI		
1. Dunav - GC-1 Novi Sad	+	+	+	/	/	/	+	/	+	/	/	/	/	+	
2. Dunav - GC-2 Novi Sad	+	+	+	/	/	/	+	/	+	/	/	/	/	+	
3. Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	+	-	+	/	/	/	+	/	+	/	/	/	/	-	
4. Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	/	/	/	/	/	-	/	/	+	/	-	/	/	/	
5. Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	/	/	/	/	/	-	/	/	-	/	-	/	/	/	
6. Dunav - Plavna	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	/	-	
7. Dunav - Karađorđevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	/	-	
8. Dunav - Pančevo	/	/	/	/	/	/	+	/	+	-	/	/	/	/	
9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda	/	/	/	-	/	/	/	+	/	/	/	/	-	/	
10. Krivaja - Srbobran - između 2 farme	/	/	/	-	/	/	/	+	/	/	/	/	-	/	
11. Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	
12. Krivaja - Radičević - farma svinja 2	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	
13. Krivaja - Radičević - farma 3	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	
14. Mostonga, DTD kanal - posle TP	/	/	/	/	/	/	+	/	-	+	/	/	/	/	
15. DTD kanal - Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	/	
16. DTD kanal - Odžaci	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	/	
17. DTD kanal - Bački Petrovac	/	/	/	/	/	-	/	-	/	+	/	/	/	/	
18. DTD kanal - Melenci-Bašaid	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	/	-	
19. DTD kanal - Kikinda	/	/	/	/	+	/	/	-	/	/	/	/	/	-	
20. Paličko jezero - posle TP	/	/	/	/	/	/	+	/	+	+	/	/	/	/	
21. Paličko jezero- plaža	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	/	
22. Tisa - Čurug - plaža	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	/	
23. Jegrička - Žabalj	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	/	
24. Begej - Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	+	-	/	/	+	/	/	/	
25. Obedska bara - Obrež	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	/	-	
26. Sava - Sr. Mitrovica-plaža	/	/	/	/	/	/	+	-	/	/	/	/	/	-	
27. Sava - Sr. Mitrovica	/	/	/	/	/	/	+	+	/	/	/	/	/	-	
28. Rakovački potok - Rakovac	/	/	/	/	/	/	+	/	-	-	/	/	/	/	
29. Veliki bački kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	+	/	+	/	+	/	/	/	
30. KCIII kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	+	/	+	/	+	/	/	/	
31. Gradska kanalizacija Sombor	/	/	/	/	/	/	+	/	-	+	/	/	/	/	
32. Gradska kanalizacija Odzaci	/	/	/	/	/	/	+	/	+	-	/	/	/	/	
33. Gradska kanalizacija Subotica, Palić	/	/	/	/	/	/	+	/	+	-	/	/	/	/	

Legenda: 1-30-Lokaliteti uzorkovanih površinskih voda; 31-33-Lokaliteti uzoraka gradske kanalizacione vode; III-XII -Meseci tokom kojih je vršeno uzorkovanje; „+“ pozitivni uzorci; „-“ negativni uzorci; „/“ nisu ispitivani uzorci; TP-tretman prečišćavanja

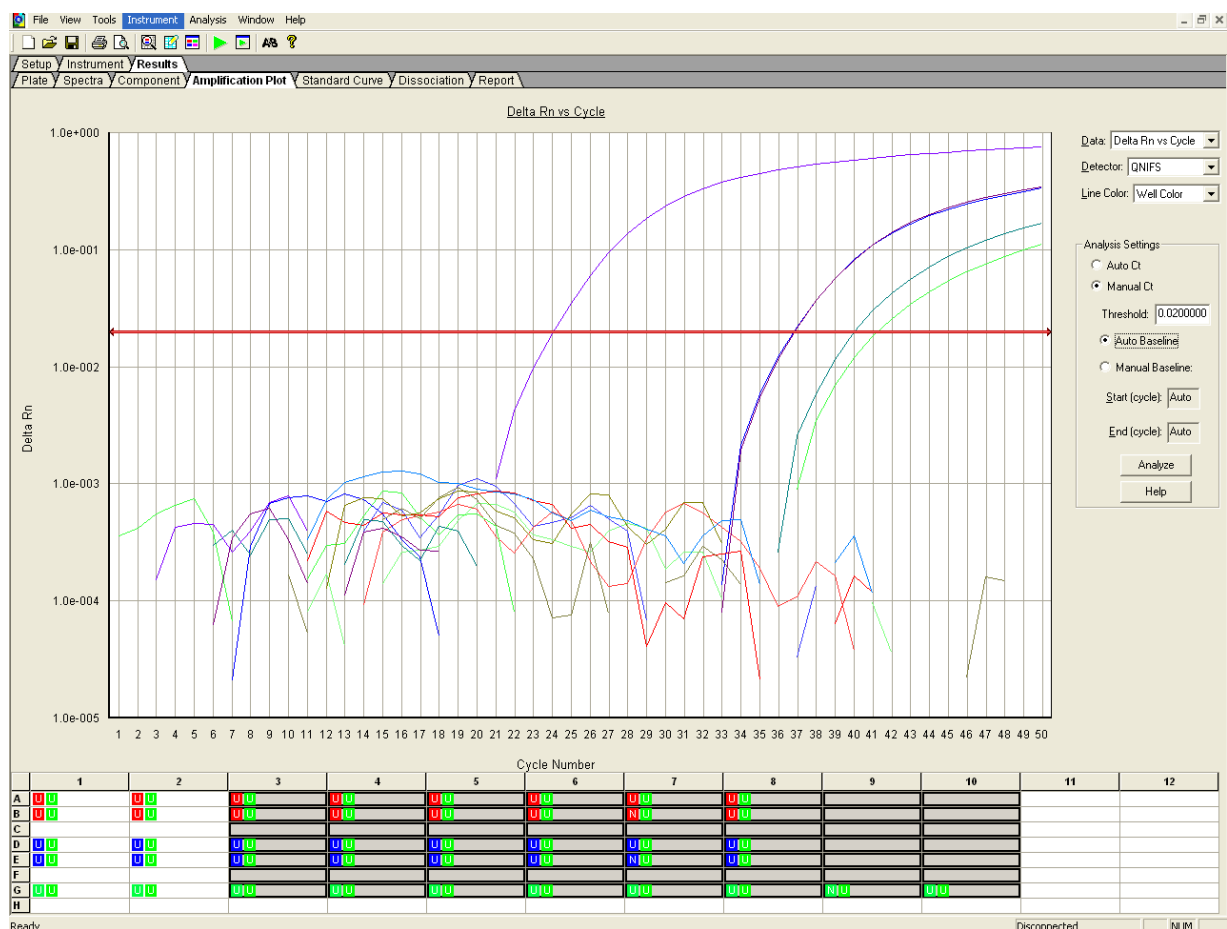
U ispitanim uzorcima površinskih voda koje se koriste za rekreaciju, a koje su uzorkovane na mestima javnih kupališta (lokaliteti br. 3, 4, 5, 21, 22 i 26), u 28,6% (6/21) je utvrđeno



prisustvo NoV GII (lokaliteti br. 3, 4 i 26). Od 30 uzoraka površinskih voda koje su pod uticajem izliva kanalizacije bez tretmana prečišćavanja i koje su uzorkovane nizvodno od izliva kanalizacije, u 66,7% (22/30) je utvrđeno prisustvo norovirusa. U pitanju su lokaliteti pod brojevima: 1, 2, 8, 16, 19, 24, 27 i 30. Od 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, NoV GII nije detektovan niti u jednom uzorku. Takođe, u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, kao i u SRP Obedska bara nije detektovan NoV GII. Od 15 uzoraka u blizini farmi NoV je detektovan u 13,3% (2/15) uzoraka.

Norovirus GII nije detektovan na 43,3% (13/30) lokaliteta površinskih voda. U pitanju su lokaliteti: Dunav Štrand 2, Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, 3 lokaliteta reke Krivaja, DTD kanal u Somboru, Odžacima, između Melenaca i Bašaida, plaža na Palićkom jezeru, Tisa u Čurugu, Jegrička u Žablju i Obedska bara (Tab.7).

Na slici 54. su prikazani neki od rezultata utvrđivanja prisustva norovirusa GII metodom real-time RT-PCR.



Slika 54. Detekcija NoV GII u uzorcima vode metodom real-time RT-PCR



5.1.3 Prisustvo norovirusa genogrupe I

Norovirus genogrupe I (NoV GI) je detektovan u 15.2% (15/99) uzoraka na 33.3% (10/30) lokaliteta i u 50,0% (6/12) površinskih voda (reke Dunav i Sava, DTD, Veliki bački i KCIII kanali, jezero Palić). Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode u 22,2% (2/9) uzoraka je detektovan NoV GI (Tab.8).

Tokom zime 2012. godine NoV GI je detektovan u 11,1% (1/9) uzoraka reke Dunav na tri lokaliteta u Novom Sadu. U sezoni leto 2013. godine NoV GI je detektovan u 16,7% (5/30) uzoraka površinske vode, a nije detektovan niti u jednom od uzorka influenta gradske kanalizacije. U periodu uzorkovanja jesen/zima 2013. godine NoV GI je detektovan u 3,3% (1/30) uzoraka površinske vode i 33,3% (1/3) uzorka influenta gradske kanalizacije. Na proleće 2014. godine ovaj virus je detektovan u 26.7% (8/30) uzoraka površinskih voda i 33.3% (1/3) uzorka influenta gradske kanalizacije. Influenti gradske kanalizacije u Somboru i Subotici su bili negativni u sve tri sezone uzorkovanja. Uzorci gradske kanalizacione vode u Odžacima su bili pozitivni u 2 od 3 uzorkovanja. Efluent u Somboru je bio negativan u sva tri slučaja uzorkovanja, kao i recipijent u Odžacima, dok je uzorak nakon tretmana prečišćavanja u Subotici bio pozitivan samo u jednom od 3 uzorka.

U ispitanim uzorcima površinskih voda koje se koriste za rekreaciju, a koje su uzorkovane na mestima javnih kupališta, u 19,1% (4/21) uzoraka je utvrđeno prisustvo NoV GI (lokaliteti br. 3, 4, 5 i 26).

U uzorcima površinskih voda koje su pod uticajem izliva kanalizacije bez tretmana prečišćavanja i koje su uzorkovane nizvodno od izliva kanalizacije, u 23,3% (7/30) je utvrđeno prisustvo NoV GI. U pitanju su lokaliteti pod brojevima: 1, 2 i 30. U 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, NoV GI nije detektovan. U parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, kao i u SRP Obedska bara nije detektovan NoV GI. Takođe, nije utvrđeno prisustvo ovog virusa u 15 uzoraka u blizini farmi životinja. Norovirus GI nije detektovan na 66,7% (20/30) lokaliteta površinskih voda i jednom od tri lokaliteta gradske kanalizacione vode (33,3%) (Tab.8).

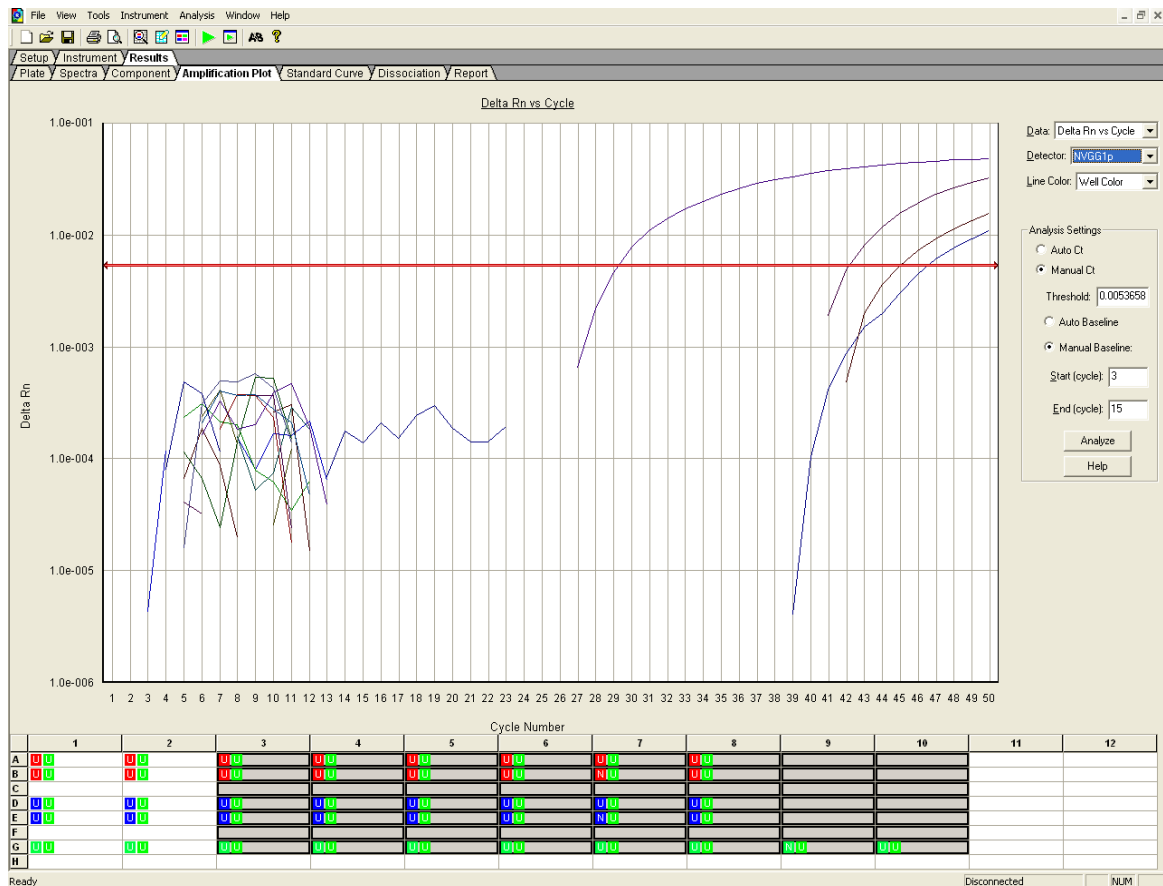


Tabela 8. Rezultati utvrđivanja prisustva NoV GI metodom real-time RT-PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja

NoV GI Lokalitet	2012			2013				2013			2014			
	X	XI	XII	VI	VII	IX	X	XI	XII	III	IV	V	VI	
1. Dunav - GC-1 Novi Sad	-	-	-	/	/	+	/	-	/	/	/	/	+	
2. Dunav - GC-2 Novi Sad	+	-	-	/	/	+	/	+	/	/	/	/	+	
3. Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	-	-	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	+	
4. Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	/	/	/	/	-	/	/	-	/	+	/	/	/	
5. Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	/	/	/	/	+	/	/	-	/	-	/	/	/	
6. Dunav - Plavna	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-	
7. Dunav - Karađorđevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-	
8. Dunav - Pančevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
10. Krivaja - Srbobran - između 2 farme	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
11. Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
12. Krivaja - Radičević - farma svinja 2	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
13. Krivaja - Radičević - farma 3	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
14. Mostonga, DTD kanal - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
15. DTD kanal - Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
16. DTD kanal - Odžaci	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
17. DTD kanal - Bački Petrovac	/	/	/	/	/	-	/	-	/	+	/	/	/	
18. DTD kanal - Melenci-Bašaid	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-	
19. DTD kanal - Kikinda	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-	
20. Paličko jezero - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	+	/	/	/	
21. Paličko jezero- plaža	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
22. Tisa - Čurug - plaža	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	
23. Jegrička - Žabalj	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	
24. Begej - Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	-	/	/	
25. Obedska bara - Obrež	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	
26. Sava - Sr. Mitrovica-plaža	/	/	/	/	/	/	+	-	/	/	/	/	-	
27. Sava - Sr. Mitrovica	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	
28. Rakovački potok - Rakovac	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
29. Veliki bački kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	+	/	-	/	+	/	/	
30. KCIII kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	+	/	/	
31. Gradska kanalizacija Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
32. Gradska kanalizacija Odzaci	/	/	/	/	/	/	-	/	+	+	/	/	/	
33. Gradska kanalizacija Subotica, Palić	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	

Legenda: 1-30-Lokaliteti uzorkovanih površinskih voda; 31-33-Lokaliteti uzoraka gradske kanalizacione vode; III-XII -Meseci tokom kojih je vršeno uzorkovanje; „+“ pozitivni uzorci; „-“ negativni uzorci; „/“ nisu ispitivani uzorci; TP-tretman prečišćavanja

Na slici 55. su prikazani neki od rezultata utvrđivanja prisustva norovirusa GI metodom real-time RT-PCR.



Slika 55. Detekcija NoV GI u uzorcima vode metodom real-time RT-PCR

5.1.4 Prisustvo adenovirusa svinja

Adenovirus svinja (PAdV) je detektovan u 11,1% (11/99) uzoraka, na 30,0% (9/30) lokaliteta i u 41,7% (5/12) ispitivanih površinskih voda (reke Dunav, Sava, Krivaja i Begej, kao i DTD kanal) (Tab.9).

Tokom zime 2012. godine PAdV je detektovan u 22,2% (2/9) uzoraka reke Dunav na tri lokaliteta u Novom Sadu. U sezoni leto 2013. godine PAdV je detektovan u 10,0% (3/30) uzoraka površinskih voda. U periodu uzorkovanja jesen/zima 2013. godine PAdV je detektovan u 6,7% (2/30) uzoraka površinskih voa. Na proleće 2014. godine PAdV je detektovan u 13,3% (4/30) ispitanih uzoraka površinskih voda. Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode niti u jednom nije detektovan PAdV. Takođe, PAdV nije detektovan u efluentima u Subotici i Somboru nakon tretmana prečišćavanja.



Tabela 9. Rezultati utvrđivanja prisustva PAdV metodom real-time PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja

PAdV Lokalitet	2012			2013				2013				2014			
	X	XI	XII	VI	VII	IX	X	XI	XII	III	IV	V	VI		
1. Dunav - GC-1 Novi Sad	-	+	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	+		
2. Dunav - GC-2 Novi Sad	-	-	+	/	/	-	/	-	/	/	/	/	+		
3. Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	-	-	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	+		
4. Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	/	/	/	/	-	/	/	-	/	-	/	/	/		
5. Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	/	/	/	/	-	/	/	-	/	-	/	/	/		
6. Dunav - Plavna	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-		
7. Dunav - Karađorđevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-		
8. Dunav - Pančevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	+	/	/	/		
9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda	/	/	/	+	/	/	/	-	/	/	/	/	-		
10. Krivaja - Srbobran - između 2 farme	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-		
11. Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-		
12. Krivaja - Radičević - farma svinja 2	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-		
13. Krivaja - Radičević - farma 3	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-		
14. Mostonga, DTD kanal - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		
15. DTD kanal - Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		
16. DTD kanal - Odžaci	/	/	/	/	/	/	+	/	-	-	/	/	/		
17. DTD kanal - Bački Petrovac	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/	/		
18. DTD kanal - Melenci-Bašaid	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	/	-		
19. DTD kanal - Kikinda	/	/	/	/	+	/	/	-	/	/	/	/	-		
20. Paličko jezero - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		
21. Paličko jezero- plaža	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		
22. Tisa - Čurug - plaža	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/		
23. Jegrička - Žabalj	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/		
24. Begej - Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	-	+	/	/	-	/	/		
25. Obedska bara - Obrež	/	/	/	/	/	/	-	/	/	/	/	/	-		
26. Sava - Sr. Mitrovica-plaža	/	/	/	/	/	/	-	+	/	/	/	/	-		
27. Sava - Sr. Mitrovica	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-		
28. Rakovački potok - Rakovac	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		
29. Veliki bački kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/		
30. KCIII kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/		
31. Gradska kanalizacija Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		
32. Gradska kanalizacija Odzaci	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		
33. Gradska kanalizacija Subotica, Palić	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/		

Legenda: 1-30-Lokaliteti uzorkovanih površinskih voda; 31-33-Lokaliteti uzoraka gradske kanalizacione vode; III-XII -Meseci tokom kojih je vršeno uzorkovanje; „+“ pozitivni uzorci; „-“ negativni uzorci; „/“ nisu ispitivani uzorci; TP-tretman prečišćavanja

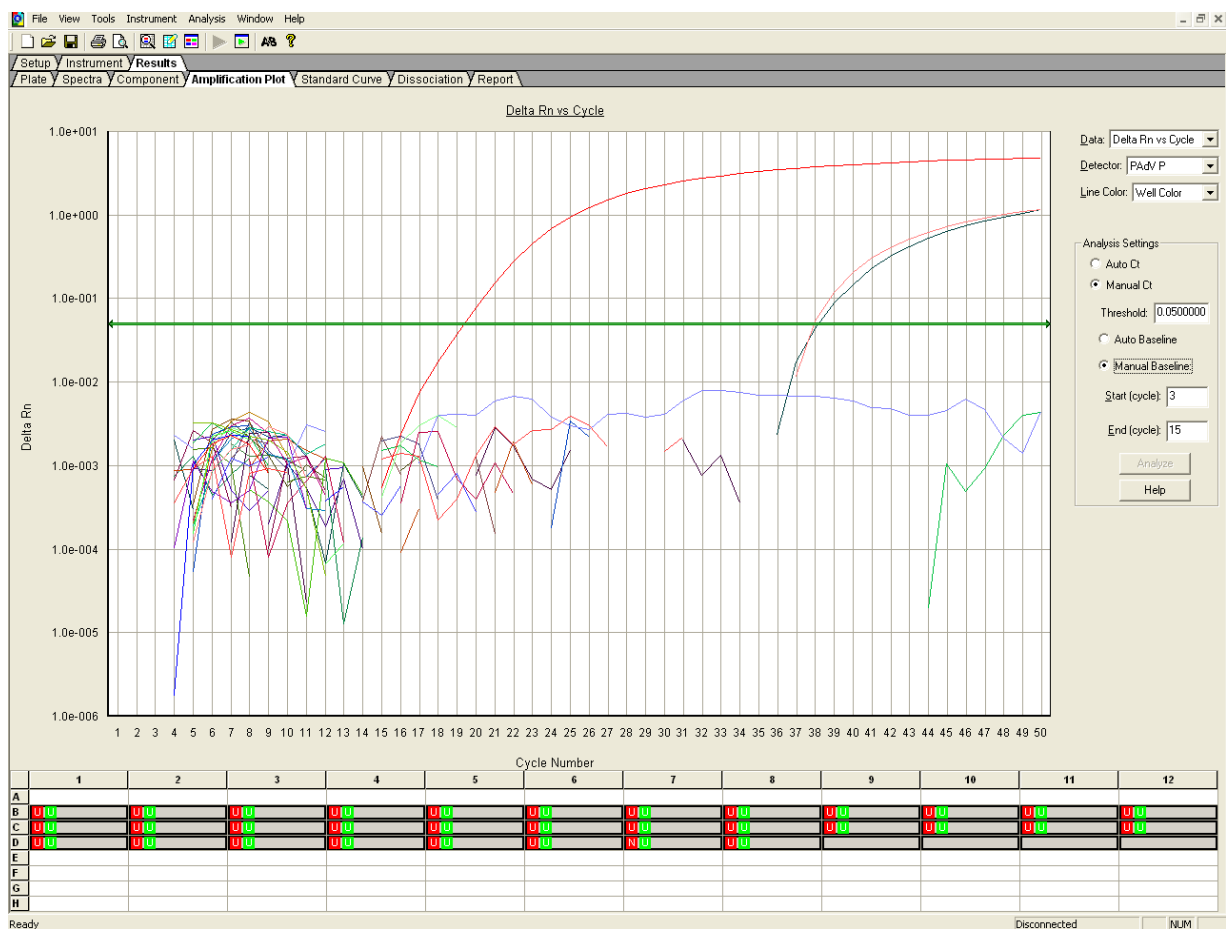
U ispitanim uzorcima površinskih voda koje se koriste za rekreaciju, a koje su uzorkovane na mestima javnih kupališta, u 9,5% (2/21) je utvrđeno prisustvo PAdV. U pitanju su plaža Oficirac u Novom Sadu i plaža na reci Savi u Sremskoj Mitrovici. U uzorcima površinskih voda koje su pod uticajem izliva kanalizacije bez tretmana prečišćavanja i koje su uzorkovane nizvodno od izliva kanalizacije, u 26,7% (8/30) je utvrđeno prisustvo PAdV. U pitanju su lokaliteti: reka Dunav (GC1, GC2 i u Pančevu), reka Begej i DTD kanal u Odžacima i Kikindi). Od 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, prisustvo PAdV nije



utvrđeno. Takođe, u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, kao i u SRP Obedska bara nije detektovan ovaj virus. Od 15 uzoraka u blizini farmi životinja prisustvo PAdV je utvrđeno u jednom (6,7%) uzorku.

Adenovirus svinja nije detektovan na 70,0% (21/30) lokaliteta površinskih voda, niti na ispitanim lokalitetima gradske kanalizacione vode (Tab.9).

Na slici 56. su prikazani neki od rezultata utvrđivanja prisustva adenovirusa svinja metodom real-time PCR.



Slika 56. Detekcija PAdV u uzorcima vode metodom real-time PCR

5.1.5 Prisustvo poliomavirusa goveda

Poliomavirus goveda (BPyV) je detektovan u 7.1% (7/99) uzoraka, na 23.3% (7/30) lokaliteta i u 25,0% (3/12) površinskih voda (reke Dunav, Sava i Krivaja).

Tokom zime 2012. godine BPyV nije detektovan niti u jednom od uzoraka reke Dunav na tri lokaliteta u Novom Sadu. U sezoni leto 2013. godine BPyV je detektovan u 3,3% (1/30)



uzoraka površinske vode. U periodu uzorkovanja jesen/zima 2013. godine BPyV je detektovan u 10,0% (3/30) uzoraka površinskih voda. Na proleće 2014. godine BPyV je takođe detektovan u 10,0% uzoraka površinskih voda. Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode BPyV je detektovan u jednom od testiranih uzoraka (lokalitet br. 31). Ovaj virus nije detektovan na lokalitetima nakon tretmana prečišćavanja gradskih kanalizacionih voda (Tab.10).

Tabela 10. Rezultati utvrđivanja prisustva BPyV metodom real-time PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja

BPyV Lokalitet	2012			2013				2013		2014			
	X	XI	XII	VI	VII	IX	X	XI	XII	III	IV	V	VI
1. Dunav - GC-1 Novi Sad	-	-	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	+
2. Dunav - GC-2 Novi Sad	-	-	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	+
3. Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	-	-	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	+
4. Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	/	/	/	/	-	/	/	+	/	-	/	/	/
5. Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	/	/	/	/	-	/	/	+	/	-	/	/	/
6. Dunav - Plavna	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-
7. Dunav - Karađorđevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-
8. Dunav - Pančevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/
10. Krivaja - Srbobran - između 2 farme	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/
11. Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/
12. Krivaja - Radičević - farma svinja 2	/	/	/	-	/	/	/	+	/	/	/	-	/
13. Krivaja - Radičević - farma 3	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/
14. Mostonga, DTD kanal - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
15. DTD kanal - Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
16. DTD kanal - Odžaci	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
17. DTD kanal - Bački Petrovac	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/	/
18. DTD kanal - Melenci-Bašaid	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-
19. DTD kanal - Kikinda	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-
20. Paličko jezero - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
21. Paličko jezero- plaža	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
22. Tisa - Čurug - plaža	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/
23. Jegrička - Žabalj	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/
24. Begej - Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	-	/	/
25. Obedska bara - Obrež	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-
26. Sava - Sr. Mitrovica-plaža	/	/	/	/	/	/	+	-	/	/	/	/	-
27. Sava - Sr. Mitrovica	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-
28. Rakovački potok - Rakovac	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
29. Veliki bački kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/
30. KCIII kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/
31. Gradska kanalizacija Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	+	/	/	/
32. Gradska kanalizacija Odzaci	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/
33. Gradska kanalizacija Subotica, Palić	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/

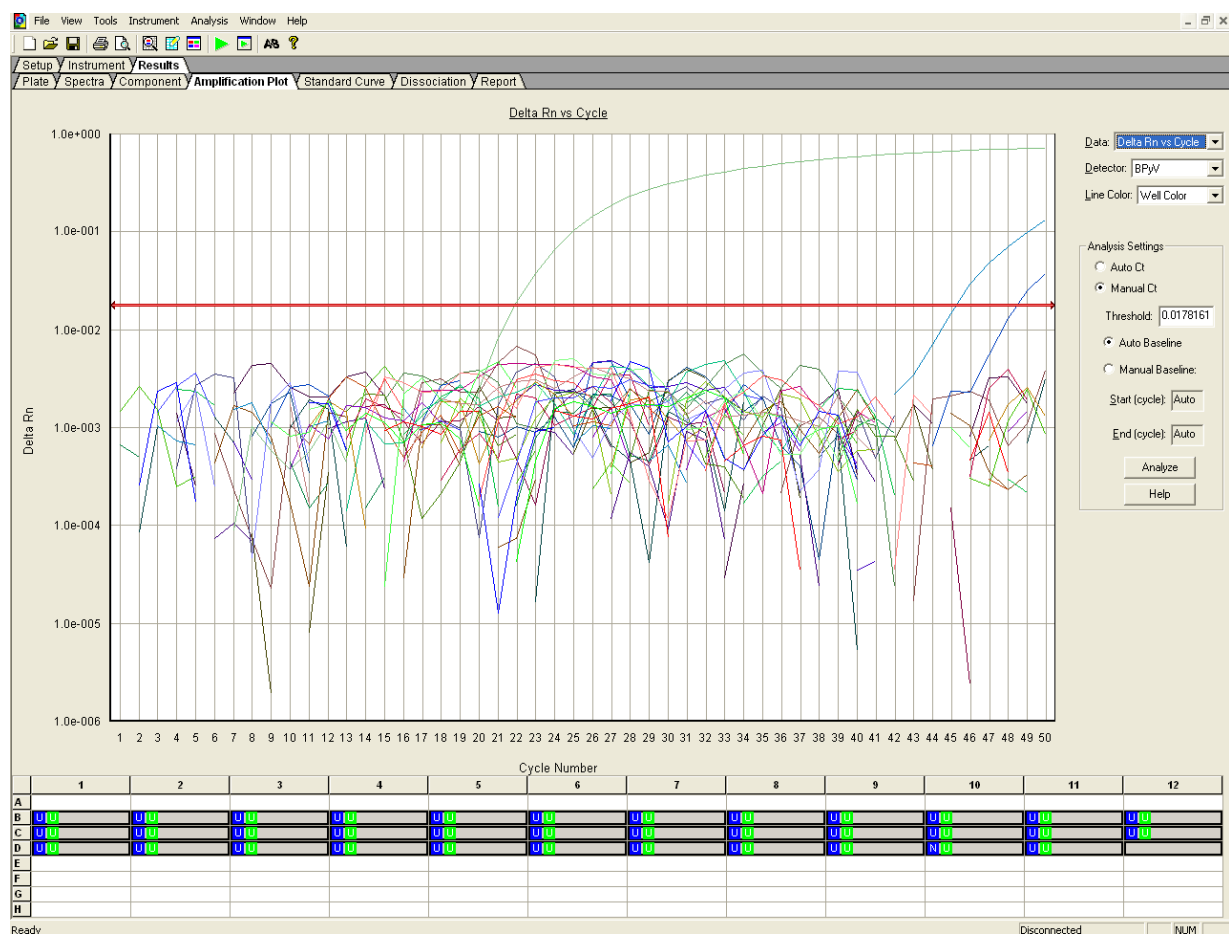
Legenda: 1-30-Lokaliteti uzorkovanih površinskih voda; 31-33-Lokaliteti uzoraka gradske kanalizacione vode; III-XII -Meseci tokom kojih je vršeno uzorkovanje; „+“ pozitivni uzorci; „-“ negativni uzorci; „/“ nisu ispitivani uzorci; TP-tretman prečišćavanja



U ispitanim uzorcima površinskih voda koje se koriste za rekreaciju, a koje su uzorkovane na mestima javnih kupališta, u 9,5% (4/21) je utvrđeno prisustvo BPyV. U pitanju su uzorci gradskih plaža u Novom Sadu (Oficirac i Štrand 1 i 2) i plaža u Sremskoj Mitrovici. U uzorcima površinskih voda koje su pod uticajem izliva kanalizacije bez tretmana prečišćavanja i koje su uzorkovane nizvodno od izliva kanalizacije, u 23,3% (2/30) je utvrđeno prisustvo BPyV. U pitanju su lokaliteti: reka Dunav (GC-1, GC-2) u Novom Sadu. U 6 ispitanih uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, prisustvo BPyV nije utvrđeno. Takođe, u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, kao i u SRP Obedska bara nije detektovan ovaj virus. Od 15 uzoraka u blizini farmi prisustvo BPyV je utvrđeno u jednom uzorku.

Poliomavirus goveda nije detektovan na 76,7% (23/30) lokaliteta površinskih voda i 66,7% (2/3) lokaliteta gradske kanalizacione vode (Tab. 10).

Na slici 57. su prikazani neki od rezultata utvrđivanja prisustva goveđeg poliomavirusa metodom real-time PCR.



Slika 57. Detekcija BPyV u uzorcima vode metodom real-time PCR



5.1.6 Prisustvo hepatitis E virusa

Hepatitis E virus je detektovan u 3.0% (3/99) uzoraka, na 10,0% (3/30) lokaliteta i u 25,0% (3/12) ispitivanih površinskih voda (reke Dunav i Sava, kao i KCIII kanal) (Tab. 11).

Tabela 11. Rezultati utvrđivanja prisustva HEV metodom real-time RT-PCR po lokalitetima i sezonama uzorkovanja

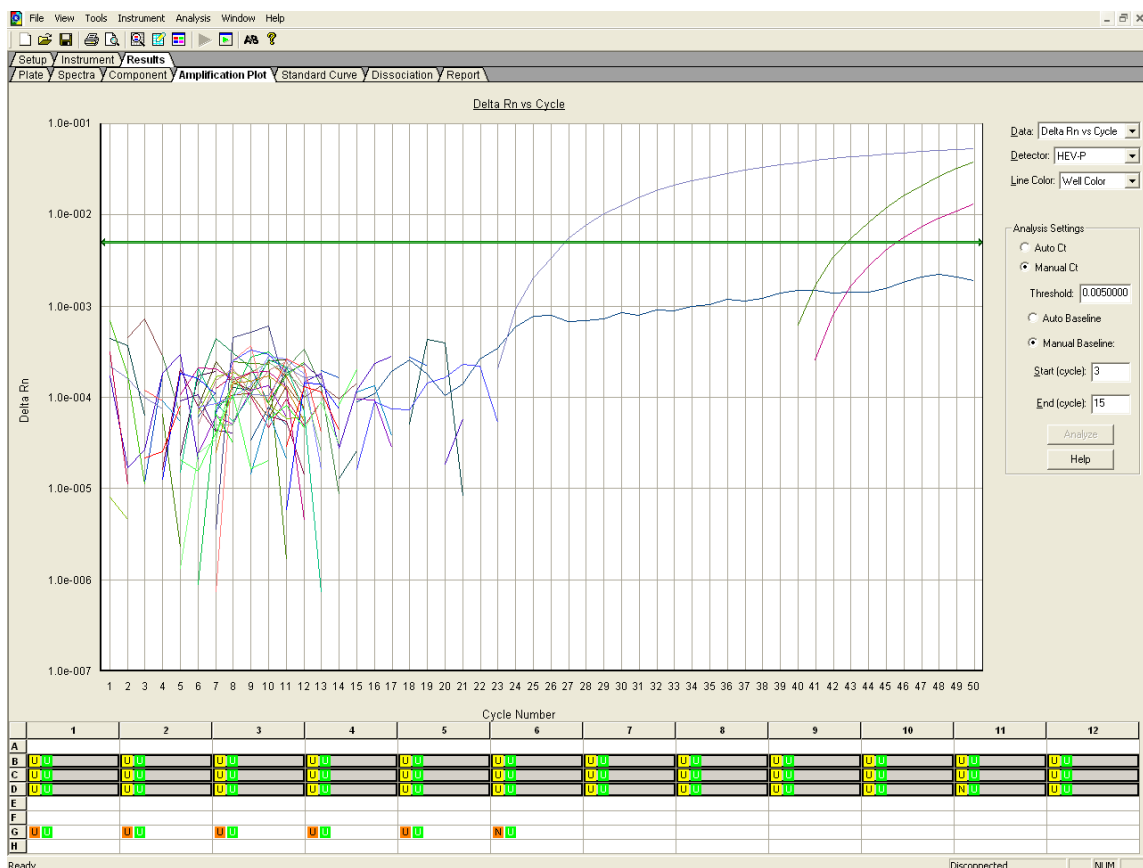
HEV Lokalitet	2012			2013				2013			2014			
	X	XI	XII	VI	VII	IX	X	XI	XII	III	IV	V	VI	
1. Dunav - GC-1 Novi Sad	-	-	+	/	/	-	/	-	/	/	/	/	-	
2. Dunav - GC-2 Novi Sad	-	-	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	-	
3. Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	-	-	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	-	
4. Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	/	/	/	/	-	/	/	-	/	-	/	/	/	
5. Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	/	/	/	/	-	/	/	-	/	-	/	/	/	
6. Dunav - Plavna	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-	
7. Dunav - Karađorđevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	/	/	-	
8. Dunav - Pančevo	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
9. Krivaja - Srbobran - pored farme goveda	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
10. Krivaja - Srbobran - između 2 farme	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
11. Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
12. Krivaja - Radičević - farma svinja 2	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
13. Krivaja - Radičević - farma 3	/	/	/	-	/	/	/	-	/	/	/	-	/	
14. Mostonga, DTD kanal - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
15. DTD kanal - Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
16. DTD kanal - Odžaci	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
17. DTD kanal - Bački Petrovac	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/	/	
18. DTD kanal - Melenci-Bašaid	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-	
19. DTD kanal - Kikinda	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	/	/	-	
20. Paličko jezero - posle TP	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
21. Paličko jezero- plaža	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
22. Tisa - Čurug - plaža	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	
23. Jegrička - Žabalj	/	/	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	
24. Begej - Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	-	/	/	
25. Obedska bara - Obrež	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	
26. Sava - Sr. Mitrovica-plaža	/	/	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	
27. Sava - Sr. Mitrovica	/	/	/	/	/	/	+	-	/	/	/	/	-	
28. Rakovački potok - Rakovac	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
29. Veliki bački kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	-	/	-	/	-	/	/	
30. KCIII kanal - Vrbas	/	/	/	/	/	/	+	/	-	/	-	/	/	
31. Gradska kanalizacija Sombor	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
32. Gradska kanalizacija Odzaci	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	
33. Gradska kanalizacija Subotica, Palić	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	/	/	/	

Legenda: 1-30-Lokaliteti uzorkovanih površinskih voda; 31-33-Lokaliteti uzoraka gradske kanalizacione vode; III-XII -Meseci tokom kojih je vršeno uzorkovanje; „+“ pozitivni uzorci; „-“ negativni uzorci; „/“ nisu ispitivani uzorci; TP-tretman prečišćavanja

Tokom zime 2012. godine HEV je detektovan u jednom od uzoraka reke Dunav uzorkovane na tri lokaliteta u Novom Sadu (11,1%). U sezoni leto 2013. godine HEV je detektovan u 6,7% (2/30) uzoraka površinske vode (lokaliteti br. 27 i 30). U periodu uzorkovanja



jesen/zima 2013. godine HEV nije detektovan niti u jednom od uzoraka površinske vode. Takođe, tokom proleća 2014. godine HEV nije detektovan. Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije niti u jednom nije detektovan HEV. Hepatitis E virus nije detektovan na 27 lokaliteta površinskih voda, niti na jednom od 3 ispitivana lokaliteta gradske kanalizacije. U ispitanim uzorcima površinskih voda koje se koriste za rekreaciju, a koje su uzorkovane na mestima javnih kupališta, niti u jednom nije utvrđeno prisustvo hepatitis E virusa. U uzorcima površinskih voda koje su pod uticajem izliva kanalizacije bez tretmana prečišćavanja i koje su uzorkovane nizvodno od izliva kanalizacije, u 10,0% (3/30) uzoraka je utvrđeno prisustvo HEV. U pitanju su lokaliteti reka Dunav u Novom Sadu (GC-1), Sava u Sremskoj Mitrovici i KCIII kanal u Vrbasu. U 6 ispitanih uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, kao i u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, i SRP Obedska bara nije detektovan HEV. Od 15 uzoraka u blizini farmi životinja prisustvo ovog virusa nije utvrđeno. Hepatitis E virus nije detektovan na 27/30 (90,0%) lokaliteta površinskih voda. Prisustvo ovog virusa nije utvrđeno u uzorcima gradske kanalizacije (Tab. 11). Na slici 58. su prikazani neki od rezultata utvrđivanja prisustva hepatitis E virusa metodom real-time RT-PCR.



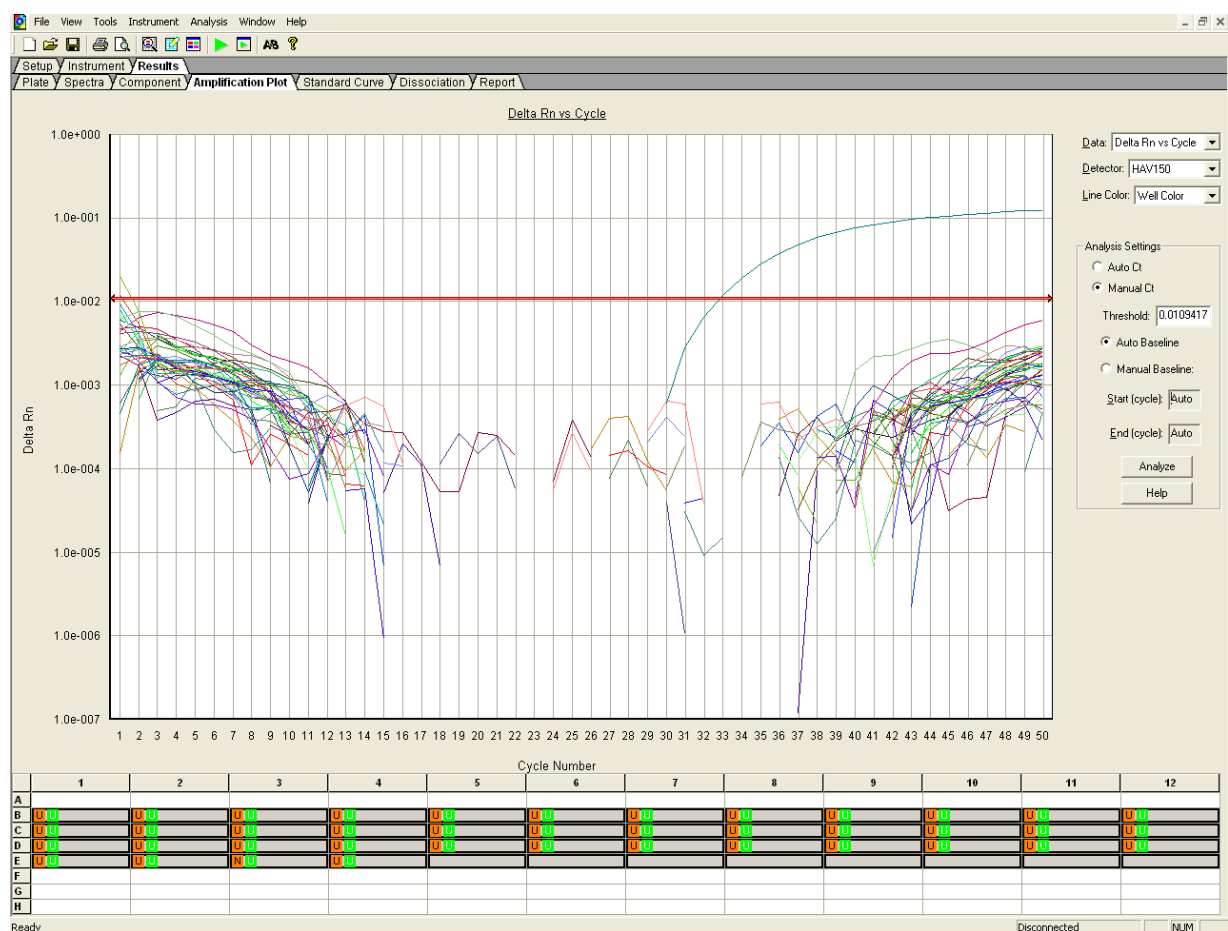
Slika 58. Detekcija HEV u uzorcima vode metodom Real-time RT-PCR



5.1.7 Prisustvo hepatitis A virusa

Hepatitis A virus (HAV) nije detektovan niti u jednom od analiziranih površinskih voda, niti u uzorcima gradske kanalizacije.

Na slici 59. su prikazani neki od rezultata utvrđivanja prisustva HAV metodom real-time RT-PCR, pri čemu se vidi da prisustvo virusa nije utvrđeno niti u jednom uzorku. Na slici se uočava samo detektovana pozitivna kontrola ovog virusa.



Slika 59. Detekcija HAV u uzorcima vode metodom real-time RT-PCR

Od ukupnog broja ispitanih površinskih voda u njih 25,0% (3/12) nije detektovan niti jedan virus (Stara Tisa, Jegrička i Specijalni rezervat prirode Obedska bara (Tab.6 - Tab.11)).



5.1.8 Prevalenca virusa po ispitanim lokalitetima

Najčešći virus koji je detektovan u ovom istraživanju je humani adenovirus. Prevalenca HAdV je iznosila 42,4% (42/99) u ukupnom broju uzoraka površinskih voda i 60,0% (18/30) u odnosu na broj testiranih lokaliteta. U ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode prevalenca HAdV je bila 44,4% (4/9). Norovirus GII je detektovan u 40,4% (40/99) uzoraka površinskih voda i na 56,7% (17/30) lokaliteta, dok je prisustvo NoV GI utvrđeno u 15,2% (15/99) ukupnog broja uzoraka površinskih voda i na 33,3% (10/30) ispitanih lokaliteta. Prevalenca NoV GII i GI u uzorcima kanalizacije je iznosila 66,7% (6/9) i 22,2% (2/9) uzoraka. Prevalenca PAdV je iznosila 11,1% (11/99) od ukupnog broja testiranih uzoraka površinskih voda i 30,0% (9/30) ispitanih lokaliteta. Međutim, od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije niti u jednom nije detektovan PAdV. Prisustvo BPyV je utvrđeno u 7,1% (7/99) ispitanih uzoraka i na 23,3% (7/30) lokaliteta. Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije BPyV je detektovan u jednom od testiranih uzoraka. Prevalenca HEV u ispitivanim uzorcima površinskih voda je bila 3,0% (3/99), kao i 10,0% (3/30) ispitanih lokaliteta. Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije niti u jednom nije detektovan HEV. Takođe, HAV nije detektovan niti u jednom od analiziranih površinskih voda, niti je detektovan u uzorcima gradske kanalizacije. Rezultati prevalencije za sve ispitivane viruse, na svim lokalitetima uljučenim u istraživanje su prikazani u Tab.12.



Tabela 12. Prevalenca virusa po ispitanim lokalitetima uzorkovanja

Lokalitet	Broj pozitivnih uzoraka/broj ispitanih uzoraka (%)						
	HAdV	NoV GII	NoV GI	PAdV	BPyV	HEV	HAV
Dunav - GC-1 Novi Sad	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	2/6 (33,3%)	2/6 (33,3%)	1/6 (16,7%)	1/6 (16,7%)	ND
Dunav - GC-2 Novi Sad	6/6 (100,0%)	6/6 (100,0%)	4/6 (66,7%)	2/6 (33,3%)	1/6 (16,7%)	ND	ND
Dunav - plaža Oficirac, Novi Sad	4/6 (66,7%)	4/6 (66,7%)	1/6 (16,7%)	1/6 (16,7%)	1/6 (16,7%)	ND	ND
Dunav - plaža Štrand 1, Novi Sad	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND
Dunav - plaža Štrand 2, Novi Sad	1/3 (33,3%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND
Dunav - Plavna	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dunav - Karađorđevo	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dunav - Pančevo	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND
Krivaja - Srbobran-pored farme goveda	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND
Krivaja - Srbobran - između 2 farme	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND	ND
Krivaja - Srbobran - farma svinja 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Krivaja - Radičević - farma svinja 2	ND	ND	ND	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND
Krivaja - Radičević - farma 3	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mostonga, DTD kanal - posle TP	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	ND	ND	ND	ND	ND
DTD kanal - Sombor	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DTD kanal - Odžaci	2/3 (66,7%)	ND	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND
DTD kanal - Bački Petrovac	ND	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND
DTD kanal - Melenci-Bašaid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DTD kanal - Kikinda	ND	1/3 (33,3%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND
Paličko jezero - posle TP	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND
Paličko jezero- plaža	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Stara Tisa - Čurug - plaža	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Jegrička - Žabalj	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Begej - Zrenjanin	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND
Obedska bara - Obrež	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sava - Sr. Mitrovica-plaža	2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	ND	ND
Sava - Sr. Mitrovica	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	ND	ND	ND	1/3 (33,3%)	ND
Rakovački potok - Rakovac	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND	ND
Veliki bački kanal - Vrbas	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	ND	ND	ND	ND
KCIII kanal - Vrbas	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	ND	ND	1/3 (33,3%)	ND
GK Subotica	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	ND	ND	ND	ND	ND
GK Sombor	ND	2/3 (66,7%)	ND	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND
GK Odžaci	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	ND	ND	ND	ND

Legenda: TP-tretman prečišćavanja; GK-gradska kanalizaciona voda; ND – virus nije detektovan niti u jednom ispitivanom uzorku



5.1.9 Prevalenca virusa po ispitanim površinskim vodama

U dve reke (Dunav i Sava) utvrđeno je istovremeno prisustvo 6 od ukupno 7 virusa (HAdV, NoV GII, NoV GI, HEV, BPyV i PAdV). Istovremeno prisustvo četiri virusa (NoV GII, HAdV, PAdV i BPyV; HAdV, NoV GII, NoV GI i HEV, kao i HAdV, NoV GII, NoV GI i PAdV) je detektovano u reci Krivaja, DTD i KCIII kanalu. Istovremeno prisustvo 3 virusa (HAdV, NoV GII i PAdV) je utvrđeno u reci Begej, dok su u Palićkom jezeru i Velikom Bačkom kanalu u Vrbasu istovremeno detektovani HAdV, NoV GII i NoV GI. Prisustvo samo jednog virusa (NoV GII) je utvrđeno u Rakovačkom potoku. U parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, i SRP Obedska bara nije detektovan niti jedan virus. U gradskoj kanalizaciji u gradu Odžaci utvrđeno je istovremeno prisustvo 3 virusa (HAdV, NoV GII i NoV GI), a u gradskoj kanalizaciji u Subotici i Somboru utvrđeno je istovremeno prisustvo 2 virusa (HAdV i NoV GII; NoV GII i BPyV) (Tab. 13).

Prevalenca HAdV je iznosila 66,7% (8/12) u ispitanim površinskim vodama. Prisustvo HAdV je utvrđeno u rekama Dunav, Sava, Begej i Krivaja, u DTD, Velikom bačkom, KCIII kanalu i jezeru Palić. Norovirus GII je detektovan u 75,0% (9/12) površinskih voda (Dunav, Sava, Begej, Krivaja reka, i DTD, Veliki bački, KCIII kanali, Palić i Rakovački potok). Prisustvo NoV GI je utvrđeno u 50,0% (6/12) ispitanih vrsta površinskih voda (Dunav, Sava, DTD, Veliki bački i KCIII kanali, Palić). Prevalenca adenovirusa svinja u ispitanih 12 vrsta površinskih voda je iznosila 41,7% (5/12), i to u rekama Dunav, Sava, Krivaja i Begej kao i u DTD kanalu. Poliomavirus goveda je detektovan u 25,0% (3/12) ispitanih vrsta površinskih voda (reke Dunav, Sava i Krivaja). Takođe, prevalenca hepatitis E virusa je iznosila 25,0% (3/12) površinskih voda (reke Dunav i Sava, KCIII kanal) (Tab.13). Takođe, rezultati prevalencije za svaki virus u svakoj ispitanjoj površinskoj vodi su prikazane u Tabeli 13.



Tabela 13. Prevalenca virusa po ispitanim površinskim vodama

	Broj pozitivnih uzoraka/broj ispitanih uzoraka (%)							Broj detektovanih virusa
	HAdV	NoV GII	NoV GI	PAdV	BPyV	HEV	HAV	
Dunav	21/33 (63,6%)	19/33 (57,6%)	9/33 (27,3%)	6/33 (18,2%)	5/33 (15,2%)	1/33 (3,0%)	ND	6/7
Sava	5/6 (83,3%)	3/6 (50,0%)	1/6 (16,7%)	1/6 (16,7%)	1/6 (16,7%)	1/6 (16,7%)	ND	6/7
Begej	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	3/7
Krivaja	3/15 (20,0%)	2/15 (13,3%)	ND	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	ND	ND	4/7
Stara Tisa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/7
Jegrička	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/7
Rakovački potok	ND	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND	ND	1/7
Paličko jezero	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)	1/6 (16,7%)	ND	ND	ND	ND	3/7
Obedska bara	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/7
DTD kanal	5/18 (27,8%)	4/18 (22,2%)	1/18 (5,5%)	2/18 (11,1%)	ND	ND	ND	4/7
Veliki Bački kanal	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	ND	ND	ND	ND	3/7
KCIII kanal	2/3 (66,7%)	3/3 (100,0%)	1/3 (33,3%)	ND	ND	1/3 (33,3%)	ND	4/7
GK Subotica	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)	ND	ND	ND	ND	ND	2/7
GK Sombor	ND	2/3 (66,7%)	ND	ND	1/3(33,3%)	ND	ND	2/7
GK Odzaci	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	ND	ND	ND	ND	3/7

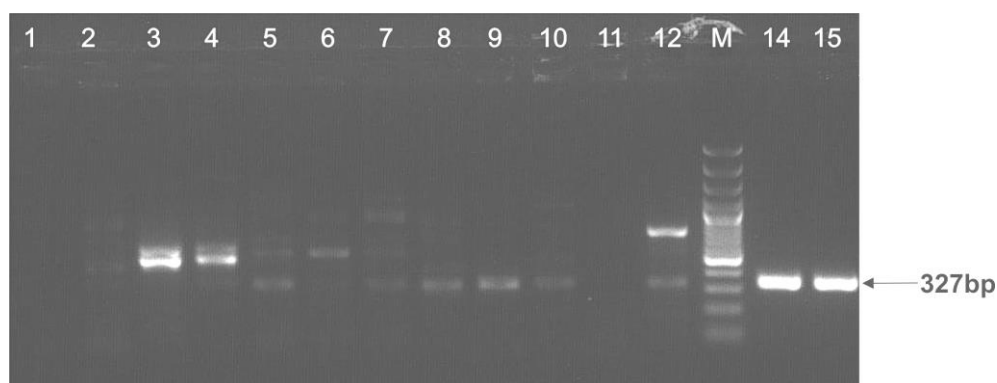
Legenda: GK-gradska kanalizaciona voda; ND – virus nije detektovan niti u jednom ispitivanom uzorku



5.2 Rezultati utvrđivanja prisustva virusa RT-PCR metodom

5.2.1 Rezultati RT-PCR testa na prisustvo NoV

Sedam uzoraka površinskih voda koji su bili pozitivni na prisustvo NoV real-time RT-PCR metodom, su ispitani i RT-PCR testom radi dobijanja produkta za sekvenciranje, potvrdu i tipizaciju detektovanog virusa. U reakciji su korišćeni prajmeri koji detektuju sve genogrupe NoV, a koji su navedeni u Tabeli 3. Pozitivan nalaz virusa se očitavao u vidu trake na gelu veličine 327 bp, kolika je i očekivana veličina produkta za ispitivani deo genoma NoV. Svih 7 odabranih pozitivnih uzoraka površinskih voda u RT-qPCR testu su potvrđeni na prisustvo NoV i konvencionalim RT-PCR testom. Pozitivna reakcija na prisustvo NoV je uočena na trakama 5, 7, 8, 9, 10 i 12. Takođe, na trakama 2, 4 i 6 je uočena pozitivna reakcija ali je traka bila veoma slabo uočljiva. Na trakama 1, 3 i 11 nije uočena pozitivna reakcija i to su uzorci koji su korišćeni koncentrovano u reakciji, dok su isti uzorci razblaženi 10^{-1} na trakama 2, 4 i 12 dali pozitivnu reakciju. Za sekvenciranje su odabrani produkti RT-PCR reakcije za uzorke gradske kanalizacione vode u Odžacima (2621/7r) i reke Sava nizvodno od izliva kanalizacije (9995/3r) (Slika 60. trake 10 i 12).



Slika 60. Detekcija RT-PCR produkata NoV na agaroznom gelu

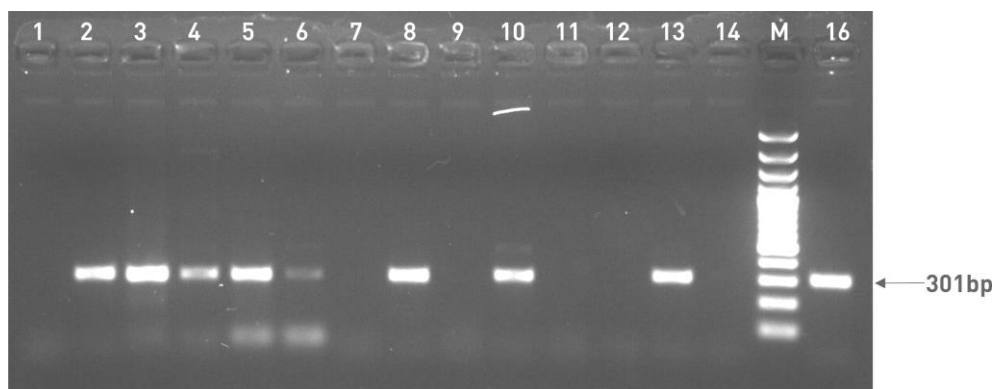
Legenda: 1. 6096/1k, 2. 6096/1r 3. 2401/3k, 4. 2401/3r, 5. 3029/1k, 6. 3029/2k, 7. 3029/2r, 8. 10708/1k, 9. 10708/1r, 10. 2621/7r, 11. 9995/3k, 12. 9995/3r, M-marker 100 bp, 14. pozitivna kontrola 1, 15. pozitivna kontrola 2.



5.3 Rezultati utvrđivanja prisustva virusa PCR metodom

5.3.1 Rezultati PCR testa na prisustvo HAdV

Sedam uzoraka površinskih voda koji su bili pozitivni na prisustvo HAdV real-time PCR metodom, su ispitani i PCR testom. U reakciji su korišćeni prajmeri navedeni u Tabeli 3. Pozitivan nalaz virusa se očitavao u vidu trake na gelu veličine 301 bp, kolika je i očekivana veličina produkta za ispitivani deo genoma HAdV. Od 7 odabranih pozitivnih uzoraka površinskih voda u real-time PCR testu, na prisustvo HAdV konvencionalim PCR testom je potvrđeno 6 uzoraka. Pozitivna reakcija na prisustvo HAdV je uočena na trakama 2, 3, 4, 5, 6, 8 i 13. Na trakama 1, 7 i 9 nije uočena pozitivna reakcija i to su uzorci koji su korišćeni koncentrovano u reakciji, dok su isti uzorci razblaženi 10^{-1} na trakama 2, 8 i 10 dali pozitivnu reakciju. Jedan uzorak koji je bio pozitivan u real-time PCR testu je bio negativan u PCR testu, kako koncentrovan, tako i razblažen (trake 11 i 12 oznaka uzoraka 3029/1k i 3029/1r). Za sekvenciranje su odabrani produkti PCR reakcije za uzorke: Dunav GC-1 Novi Sad (6096/1r), 2 uzorka Paličkog jezera nakon tretmana prečišćavanja (8454/1r) i (2401/3r), gradska kanalizacija u Subotici (8454/3r), gradska kanalizacija u Odžacima (8745/5r) i Veliki Bački kanal u Vrbasu (3029/1k) (Slika 61. trake 2, 4, 6, 8, 10 i 13).



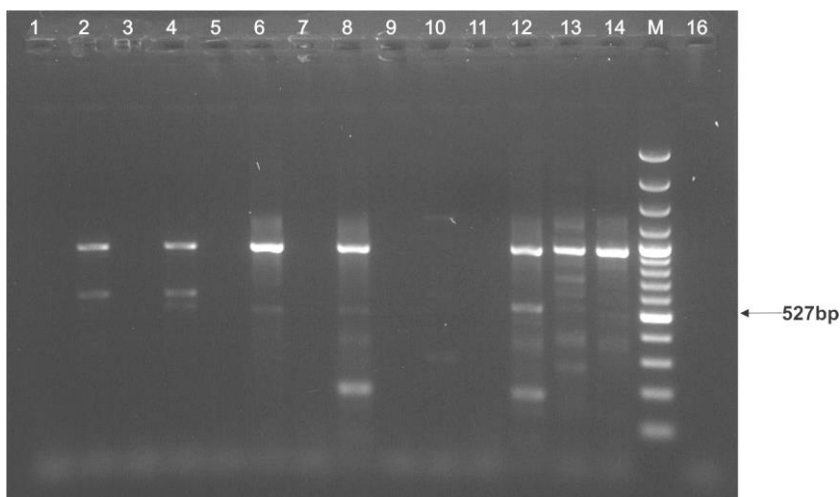
Slika 61. Detekcija PCR produkata HAdV na agaroznom gelu

Legenda: 1. 6096/1k, 2. 6096/1r, 3. 8454/1k, 4. 8454/1r, 5. 2401/3k, 6. 2401/3r, 7. 8454/3k, 8. 8454/3r, 9. 8745/5k, 10. 8745/5r, 11. 3029/2k, 12. 3029/2r, 13. 3029/1k, 14. negativna kontrola, M-marker 100 bp, 16. pozitivna kontrola.



5.3.2 Rezultati PCR testa na prisustvo BPyV

Osam uzoraka površinskih voda koji su bili pozitivni na prisustvo BPyV real-time PCR metodom, su ispitani i PCR testom. U reakciji su korišćeni prajmeri navedeni u Tabeli 3. Pozitivan nalaz virusa se očitavao u vidu trake na gelu veličine 527 bp, kolika je i očekivana veličina produkta za ispitivani deo genoma BPyV. Od 8 odabranih pozitivnih uzoraka površinskih voda u real-time PCR testu, na prisustvo BPyV konvencionalim PCR testom je potvrđeno 5 uzoraka. Pozitivna reakcija na prisustvo BPyV je uočena na trakama 6, 8, 12, 13 i 14. Na trakama 5, 7 i 11 nije uočena pozitivna reakcija i to su uzorci koji su korišćeni koncentrovano u reakciji, dok su isti uzorci razblaženi 10^{-1} na trakama 6, 8 i 12 dali pozitivnu reakciju (Sl.62). Tri uzorka koji su bili pozitivni u real-time PCR testu su bili negativni u PCR testu, kako koncentrovani, tako i razblaženi (Sl.62 trake 1, 2, 3, 4, 9 i 10). Svi produkti iz PCR testa su korišćeni kao uzorci za nested PCR.



Slika 62. Detekcija PCR produkata BPyV na agaroznom gelu

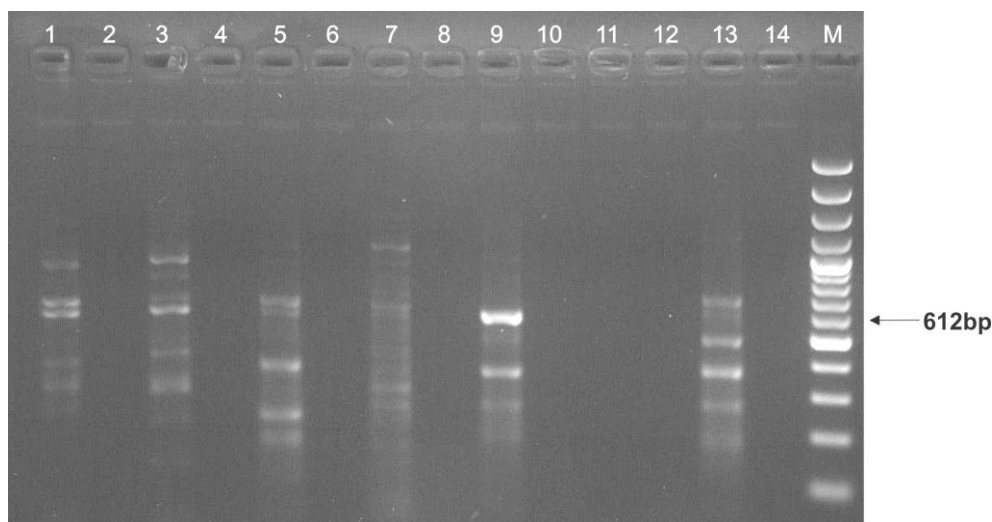
Legenda: 1. 6096/1k, 2. 6096/1r, 3. 6096/2k, 4. 6096/2r, 5. 6096/3k, 6. 6096/3r, 7. 8424/1k, 8. 8424/1r, 9. 2621/6k, 10. 2621/6r, 11. 8424/2k, 12. 8424/2r (pozitivna kontrola - uzorak iz qPCR testa), 13. 9144/4r, 14. 8921/2r, M-marker 100 bp, 16.negativna kontrola.

5.3.3 Rezultati PCR testa na prisustvo PAdV

Sedam uzoraka površinskih voda koji su bili pozitivni na prisustvo PAdV real-time PCR metodom, su ispitani i PCR testom. U reakciji su korišćeni prajmeri navedeni u Tabeli 3. Pozitivan nalaz virusa se očitavao u vidu trake na gelu veličine 612 bp, kolika je i očekivana veličina produkta za ispitivani deo genoma PAdV. Od 7 odabranih pozitivnih uzoraka



površinskih voda u real-time PCR testu, konvencionalim PCR testom na prisustvo PAdV pozitivna reakcija je uočena na trakama 1, 3, 5, 7, 9 i 13. Na trakama 2, 4, 6 i 8 nije uočena pozitivna reakcija i to su uzorci koji su korišćeni koncentrovano u reakciji, dok su isti uzorci razblaženi 10^{-1} na trakama 3, 5, 7 i 9 dali pozitivnu reakciju (Sl.63). Dva uzorka koja su bila pozitivna u real-time PCR testu su bili negativni u PCR testu (jedan uzorak je postavljen koncentrovano i razblažen 10^{-1}) (trake 10, 11 i 12 uzorci oznaka 9547/2kr, 9547/2r i 8745/3k). Deset produkata iz PCR testa su korišćeni kao uzorci za nested PCR (trake 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 13).



Slika 63. Detekcija PCR produkata PAdV na agaroznom gelu

Legenda: 1. 6096/1r, 2. 6096/2k, 3. 6096/2r, 4. 6096/3k, 5. 6096/3r, 6. 5677/2k, 7. 5677/2r, 8. 9995/2k, 9. 9995/2r (pozitivna kontrola - uzorak iz qPCR testa), 10. 9547/2k, 11. 9547/2r, 12. 8745/3k, 13. 6096/1k, 14. negativna kontrola, M-marker 100 bp.

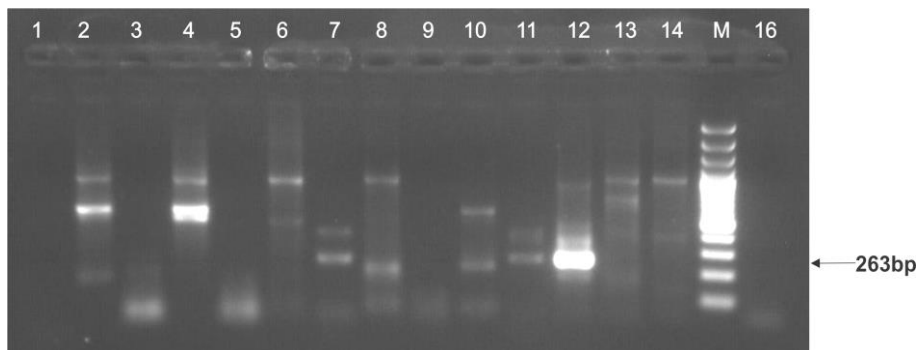
5.4 Rezultati utvrđivanja prisustva virusa nested PCR metodom

5.4.1 Rezultati nested PCR testa na prisustvo BPyV

Produkti BPyV iz PCR reakcije su uključeni u reakciju nested PCR. U reakciji su korišćeni prajmeri navedeni u Tabeli 3. Pozitivan nalaz virusa se očitavao u vidu trake na gelu veličine 263 bp, kolika je i očekivana veličina produkta za ispitivani deo genoma BPyV. Od 5 pozitivnih produkata iz PCR testa pozitivna reakcija na prisustvo BPyV nested PCR testom je uočena na trakama 7, 11 i 12. Na ostalim trakama nije uočena pozitivna reakcija u nested PCR testu. Za sekvenciranje je odabran produkti nested PCR reakcije za uzorak vode sa



plaže Štrand, reke Dunav u Novom Sadu (8424/2r), koji je korišćen u ovom testu i kao pozitivna kontrola (uzorak iz real-time PCR metode) (Sl. 64 traka 12).

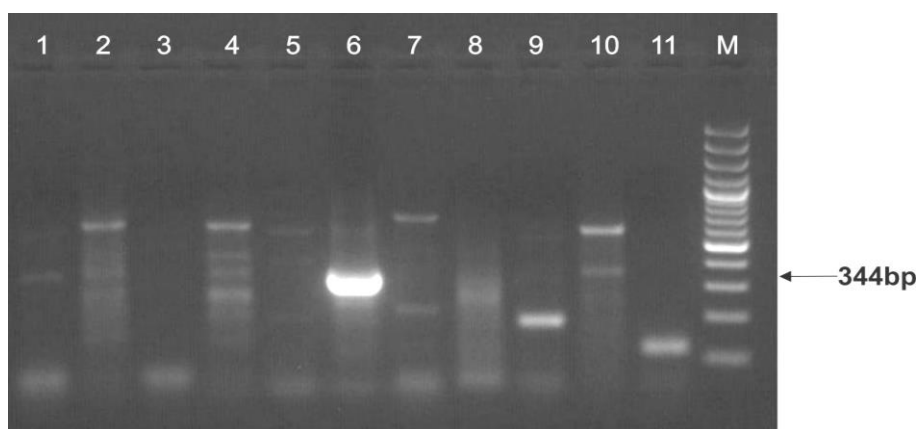


Slika 64. Detekcija nested PCR produkata BPyV na agaroznom gelu

Legenda: 1. 6096/1k, 2. 6096/1r, 3. 6096/2k, 4. 6096/2r, 5. 6096/3k, 6. 6096/3r, 7. 8424/1k, 8. 8424/1r, 9. 2621/6k, 10. 2621/6r, 11. 8424/2k, 12. 8424/2r (pozitivna kontrola - uzorak iz qPCR testa), 13. 9144/4r, 14. 8921/2r, M-marker 100 bp, 16. negativna kontrola

5.4.2 Rezultati nested PCR testa na prisustvo PAdV

Produkti PAdV iz PCR reakcije su uključeni u reakciju nested PCR. U reakciji su korišćeni prajmeri navedeni u Tabeli 3. Pozitivan nalaz virusa se očitavao u vidu trake na gelu veličine 344 bp, kolika je i očekivana veličina produkta za ispitivani deo genoma PAdV. Od 6 pozitivnih nalaza produkata iz PCR testa, kod kojih su trake na gelu bile slabo uočljive, pozitivna reakcija na prisustvo PAdV nested PCR testom je uočena na traci 6. Sekvenciran je produkt nested PCR reakcije za uzorak vode sa plaže Oficirac reke Dunav u Novom Sadu (6096/3r), koji je korišćen u ovom testu i kao pozitivna kontrola (uzorak iz real-time PCR metode) (Sl.65 traka 6).



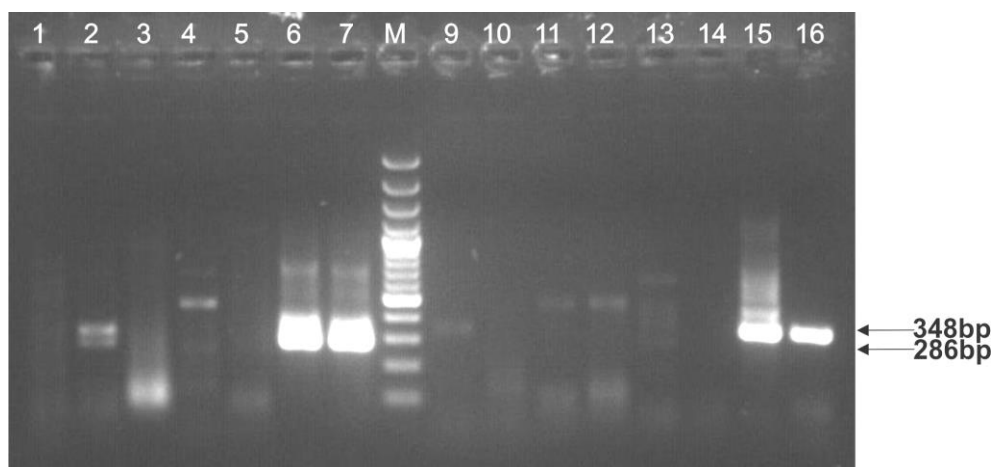
Slika 65. Detekcija nested PCR produkata PAdV na agaroznom gelu

Legenda: 1. 6096/1k 2. 6096/1r, 3. 6096/2k, 4. 6096/2r, 5. 6096/3k, 6. 6096/3r (pozitivna kontrola - uzorak iz qPCR testa), 7. 5677/2k, 8. 5677/2r, 9. 9995/2k, 10. 9995/2r, 11. negativna kontrola, M-marker 100 bp.



5.4.3 Rezultati nested PCR testa na prisustvo HEV

Tri uzorka površinskih voda koji su bili pozitivni na prisustvo HEV real-time RT-PCR metodom, su ispitani i nested PCR testom. U reakciji su korišćeni prajmeri navedeni u Tabeli 3 za RT-PCR i nested PCR. Svi produkti iz RT-PCR testa su korišćeni za nested PCR. Pozitivan nalaz virusa se očitavao u vidu trake na gelu veličine 286 bp za ORF1 deo genoma HEV i 348 bp za ORF2 deo genoma HEV, koliko su i očekivane veličina produkata za ispitivane delove genoma HEV. Od 3 odabranih pozitivnih uzoraka površinskih voda u real-time RT-PCR testu, na prisustvo HEV ORF1 i ORF2 nested PCR testom je potvrđen jedan pozitivan uzorak za ORF1 i jedan pozitivan uzorak za ORF2 deo genoma HEV. Uzorci za nested PCR su postavljeni na gel koncentrovano i u razređenju 10^{-1} . Za sekvenciranje su odabrani produkti nested PCR reakcije za uzorak vode iz reke Save nizvodno od izliva kanalizacije u Sremskoj Mitrovici (8921/3k) za ORF1 HEV i uzorak reke Dunav nizvodno od izliva kanalizacije GC-1 (10525/1k) za ORF2 HEV (Sl. 65 trake 2 i 9).



Slika 66. Detekcija nested PCR produkata HEV na agaroznom gelu

Legenda: Trake 1-7 produkti HEV ORF1: 1. 10525/1r, 2. 8921/3k, 3. 8921/3r, 4. 9664/2k, 5. 9664/2r, 6. pozitivna kontrola 52, 7. pozitivna kontrola 174, M-marker 100 bp, Trake 9-16 produkti HEV ORF2: 9. 10525/1k, 10. 10525/1r, 11. 8921/3k, 12. 8921/3r, 13. 9664/2k, 14. 9664/2r, 15. pozitivna kontrola 52, 16. pozitivna kontrola 174.



5.5 Rezultati sekvenciranja

5.5.1 Rezultati sekvenciranja dela gena za protein kapsida HAdV

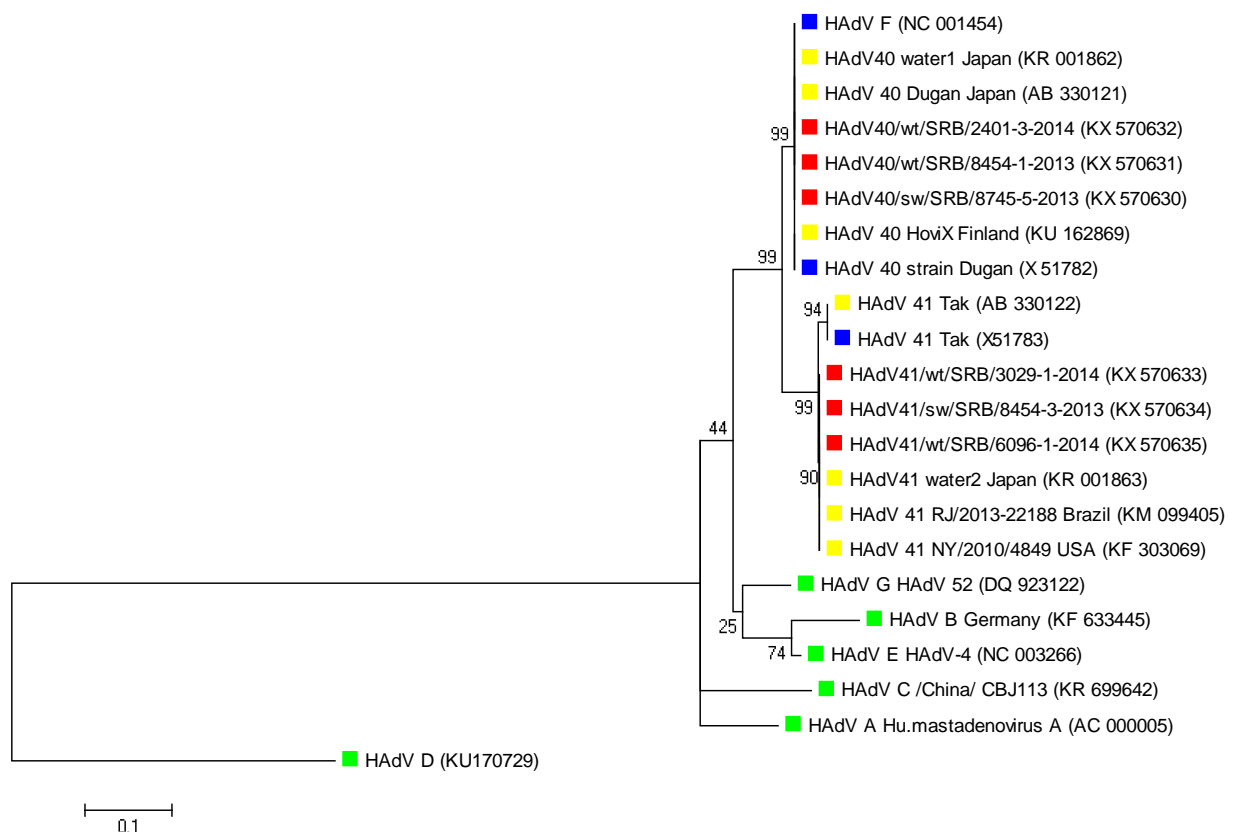
Sekvencirani delovi genoma HAdV potiču iz sledećih 6 uzoraka u kojima je detektovano njihovo prisustvo:

- gradska kanalizacija u gradu Odžaci, uzorkovana u oktobru 2013. godine i uzorak zaveden pod brojem 8745/5,
- uzorak vode iz Velikog Bačkog kanala u Vrbasu, uzorkovan u aprilu 2014. godine i zaveden pod brojem 3029/1,
- gradska kanalizacija u gradu Subotica, uzorkovana u oktobru 2013. godine i zaveden pod brojem 8454/3,
- uzorak vode iz reke Dunav u Novom Sadu, nizvodno od izliva kanalizacije GC-1, uzorkovan u junu 2014. godine i zaveden pod brojem 6096/1,
- uzorak iz jezera Palić nakon preščavanja u gradskom prečistaču, uzorkovan u oktobru 2013. godine i zaveden pod brojem 8454/1 i
- uzorak iz jezera Palić nakon preščavanja u gradskom prečistaču, uzorkovan u martu 2014. godine i zaveden pod brojem 2401/3.

Amplifikovan deo genoma hekson gena HAdV je bio dužine 301 bp. Sekvenciranje je uradjeno u oba smera (u forvard i reverznom smeru) tj. sekvencirana su oba lanca DNK dobijenog PCR produkta hekson gena. Obe sekvence svakog HAdV su analizirane i upoređene u programu FinchTV, a potom je nukleotidna sekvenca DNK lanca svakog detektovanog HAdV upoređena sa drugim sekvencama deponovanim u GenBank (NCBI GenBank). Sekvence HAdV u ovom istraživanju su deponovane u GenBank (Tab.15 u prilogu). Ukratko, sekvence HAdV u dužini od 255 nukleotida su upoređene sa još 10 sekvenci HAdV iz GenBank sa procentima sličnosti u BLASTn od 99-100% i sa 6 referentnih sekvenci drugih tipova HAdV (A, B, C, D, E i G), a zatim je formirano filogenetsko stablo (Sl. 67). Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da tri sekvence HAdV iz uzoraka vode označenih brojevima 1, 5 i 6 pripadaju HAdV tipu 40. Sekvence dela genoma HAdV su pokazale sličnost od 100% sa sekvencom HAdV izolovanog iz vode u Japanu (GenBank accession no. KR001862), sekvencom HAdV izolata Hovix (GenBank accession no. KU162869), sojem Dugan u Japanu (GenBank accession no.



AB330121). Takođe, da nukleotidne sekvence detektovanog HAdV iz ovog istraživanja pripadaju grupi F i tipu 40 potvrđeno je i na osnovu sličnosti sa referentnim izolatima: soj Dugan (GenBank accession no. X51782) i HAdV F (GenBank accession no. NC_001454) (Sl.67). Takođe, utvrđeno je i da tri sekvence HAdV iz uzoraka vode označenih brojevima 2, 3 i 4 pripadaju HAdV tipu 41. Sekvence HAdV su pokazale sličnost u 100% sa sekvencom HAdV izolovanog iz vode u Japanu (GenBank accession no. KR001863), sekvencom HAdV 41 u SAD (GenBank accession no. KM099405), sekvencom HAdV 41 u SAD (GenBank accession no. KF303069) i sojem Tak u Japanu (GenBank accession no. AB303122). Takođe, da pomenuti sekvencirani delovi genoma HAdV pripadaju tipu 41 potvrđeno je na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Tak (GenBank accession no. X51783, AB303122). Kako bi se dodatno potvrdila pripadnost grupi F i tipovima 40 i 41, HAdV sekvence su upoređene sa drugim grupama HAdV. U pitanju su sekvence tj. delovi genoma referentnih sojeva za grupe: HAdV A, HAdV B, HAdV C, HAdV D, HAdV E i HAdV G (Sl.67).



Slika 67. Molekularna filogenetska analiza HAdV

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja; ■ nukleotidne sekvence HAdV iz Srbije, ■ referentni izolati HAdV 40 i 41, ■ izolati HAdV 40 i 41, ■ izolati drugih grupa HAdV (A, B, C, D, E, G); HAdV D je korišćen kao *outgroup*.



5.5.2 Rezultati sekvenciranja dela gena RdRp/capsid NoV

Nukleotidna sekvenca detektovanog NoV GI čiji je deo gena RdRp/capsid sekvenciran, potiče iz uzorka gradske kanalizacione vode grada Odžaci, uzorkovane u martu 2014. godine i zavedene pod brojem 2621/7. Sekvenca detektovanog NoV GII, koji je takođe sekvenciran u istom delu genoma, potiče iz uzorka reke Save u Sremskoj Mitrovici, nizvodno od izliva kanalizacije, uzorkovane u novembru mesecu 2013. godine, i zavedene pod brojem 9995/3. Amplifikovan deo genoma NoV je bio dužine 327 bp. Nukleotidne sekvence NoV sekvenciranih u ovom istraživanju su deponovane u GenBank (Tab.15 u prilogu).

Sekvence dela genoma NoV GI (NoVGI/sw/SRB/2621-7-2014) i GII (NoVGII/wt/SRB/9995-3-2013) u dužini od 263 nukleotida su upoređene sa još 18 sekvenci NoV iz GenBank sa procentima sličnosti u BLASTn od 97-99% i sa 3 sekvence drugih tipova NoV (GIII, GIV, GV), a zatim je formirano filogenetsko stablo. Potvrđena je pripadnost detektovanih virusa genotipu 1 i 2, poređenjem sekvenci sa referentnim izolatima: Norwalk virus GI (GenBank accession no. M87661) i Hawaii virus GII (GenBank accession no. U07611) (Sl.68).

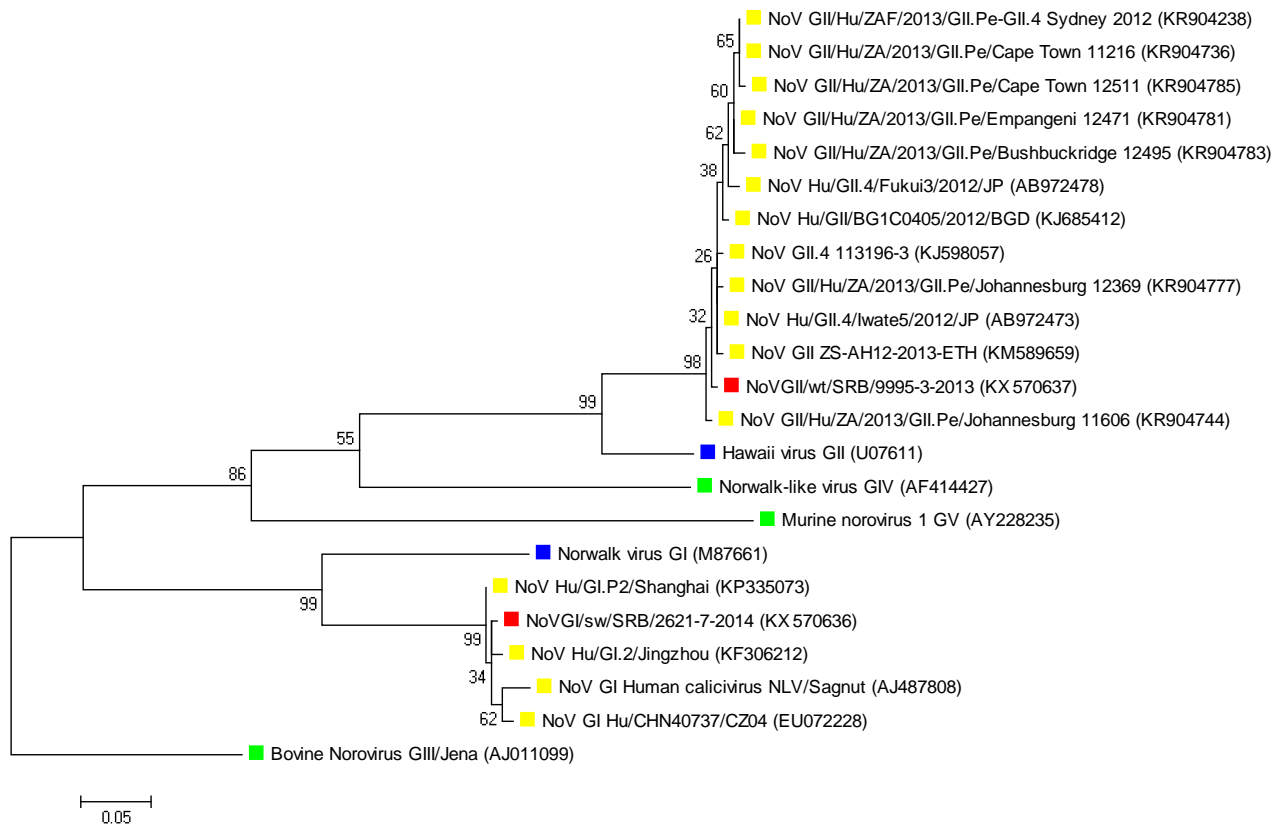
Nukleotidna sekvenca NoVGI/sw/SRB/2621-7-2014 je pokazala 99% sličnosti sa izolatom NoV Hu/GI.P2/Shanghai (GenBank accession no. KP335073), a 98% sa sekvencama NoV Hu/GI.2/Jingzhou (GenBank accession no. KF306212) i NoV iz Kine (GenBank accession no. EU072228). Sličnost od 96% je utvrđena sa sekvencom NoV Human calicivirus NLV/Sagnut (GenBank accession no. AJ487808).

Nukleotidna sekvenca NoVGII/wt/SRB/9995-3-2013 je pokazala 99% sličnosti sa sekvencama norovirusa deponovanim u GenBank (NCBI GenBank) pod brojevima KJ598057, KR904777, AB972473, KM589659 i KR904744. Ovi norovirusi su poreklom iz uzoraka stolice pacijenata izolovanih u Johaneshburgu, Japanu, Italiji, Etiopiji i Južnoafričkoj Republici. Sličnost od 98% je utvrđena sa sojevima iz Južnoafričke Republike izolovanih iz stolice dece koja su imali gastroenteritis (GenBank accession no. KR904238, KR904736, KR904785, KR904781), soja iz Japana (GenBank accession no. AB972478) i Bangladeša (GenBank accession no. KJ685412). Sličnost u 97% je bila sa sekvencom NoV poreklom iz uzoraka stolice pacijenata u Južnoafričkoj Republici (GenBank accession no. KR904783).

Kako bi se dodatno potvrdila pripadnost genotipu 1 i 2 sekvence detektovanih NoV su upoređene sa drugim genotipovima NoV. U pitanju su sekvence tj. delovi genoma



referentnih sojeva za dati genotip: Bovine norovirus GIII strain Jena (GenBank accession no. AJ011099), Norwalk-like virus GIV (GenBank accession no. AF414427) i Murine norovirus 1 GV (GenBank accession no. AY228235) (Sl.68).



Slika 68. Molekularna filogenetska analiza NoV

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja; ■ nukleotidne sekvence NoV iz Srbije, ■ referentni izolati NOV GI i GII, ■ izolati NoV GI i GII, ■ izolati drugih genotipova NoV (GIII, GIV i GV); Bovine norovirus GIII/Jena je korišćen kao *outgroup*.

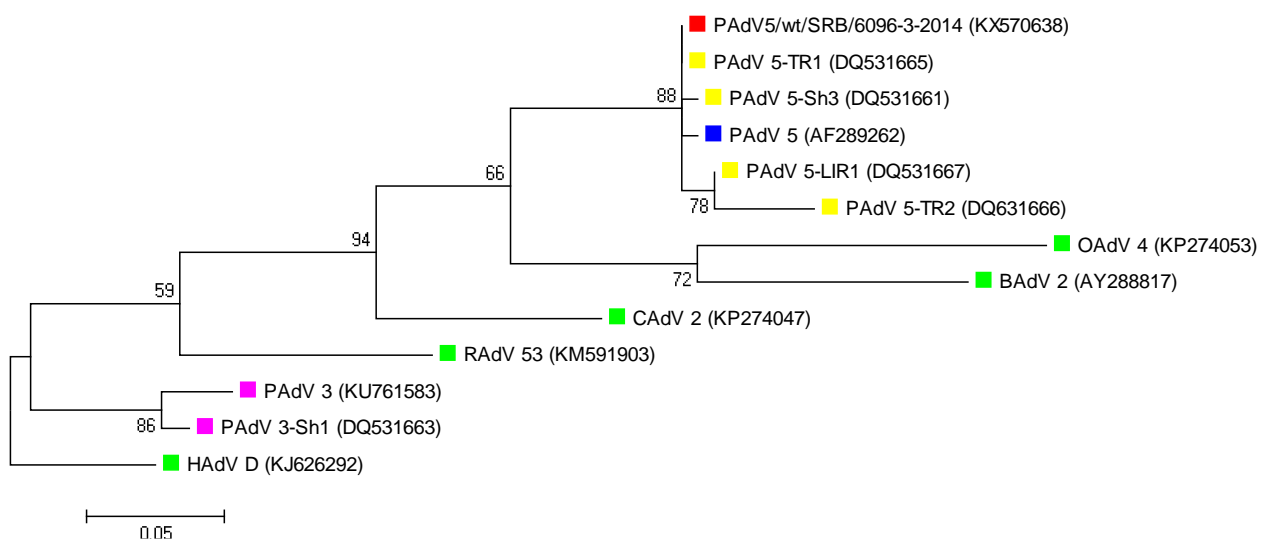
5.5.3 Rezultati sekvenciranja dela gena za protein kapsida PAdV

Sekvenciran deo genoma PAdV potiče iz uzorka reke Dunav sa plaže "Oficirac" u Novom Sadu, uzorkovana u junu 2014. godine i zavedena pod brojem 6096/3. Amplifikovan deo genoma hekson gena PAdV je bio dužine 344 bp. Sekvenca detektovanog PAdV sekvencirana u ovom istraživanju je deponovana u GenBank (Tab.15 u prilogu).



Nukleotidna sekvenca PAdV5/wt/SRB/6096-3-2014 u dužini od 171 nukleotida je upoređena sa još 12 sekvenci iz GenBank sa procentima sličnosti u BLASTn od 82-100% i formirano je filogenetsko stablo (Sl.69).

Sekvenca PAdV5/wt/SRB/6096-3-2014 je pokazala 100% sličnost sa PAdV-5 (GenBank accession no. DQ531665). Ova sekvenca je pokazala 99% sličnosti sa PAdV-5 izolovanih iz reke i otpadne vode iz domaćinstva u Španiji (GenBank accession no. DQ531661 i DQ531667), kao i sa sekvencom PAdV tip 5 (GenBank accession no. AF289262). Sekvenca PAdV5/wt/SRB/6096-3-2014 iz ovog rada pokazala je 96% sličnosti i sa sekvencom PAdV-5 (GenBank accession no. DQ531666). Istovremeno, sekvenca iz ovog rada je pokazala 86-87% sličnosti sa Caprine adenovirus-om tip 2 (GenBank accession no. KP274047), Ovine adenovirusom tip 4 (GenBank accession no. DQ630754) i Rhesus adenovirusom tip 53 (GenBank accession no. KM591903). Sekvenca PAdV5/wt/SRB/6096-3-2014 je upoređena sa sekvencama drugih genotipova PAdV, kao i sa PAdV tip 3, kako bi se dodatno potvrdila pripadnost genotipu 5 PAdV. Sličnost PAdV5/wt/SRB/6096-3-2014 sa adenovirusom svinja tip 3 je iznosila 84% (GenBank accession no. KU761583), dok je sličnost sa adenovirusom goveda (BAdV) tip 2 (GenBank accession no. AY288817) iznosila 83%. Sekvenca detektovanog PAdV 5 je bila u 82% slična sa sekvencom humanog mastadenovirusa (GenBank accession no. KJ626292) koji potiče iz stolice pacijenta u Meksiku (Kajon i sar, 2014) (Sl.69).



Slika 69. Molekularna filogenetska analiza PAdV

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja; ■ nukleotidna sekvenca PAdV iz Srbije, ■ referentni izolat PAdV5, ■ izolati PAdV tip 5, ■ izolati PAdV tip 3, ■ izolati drugih tipova adenovirusa; HAdV D je korišćen kao *outgroup*.

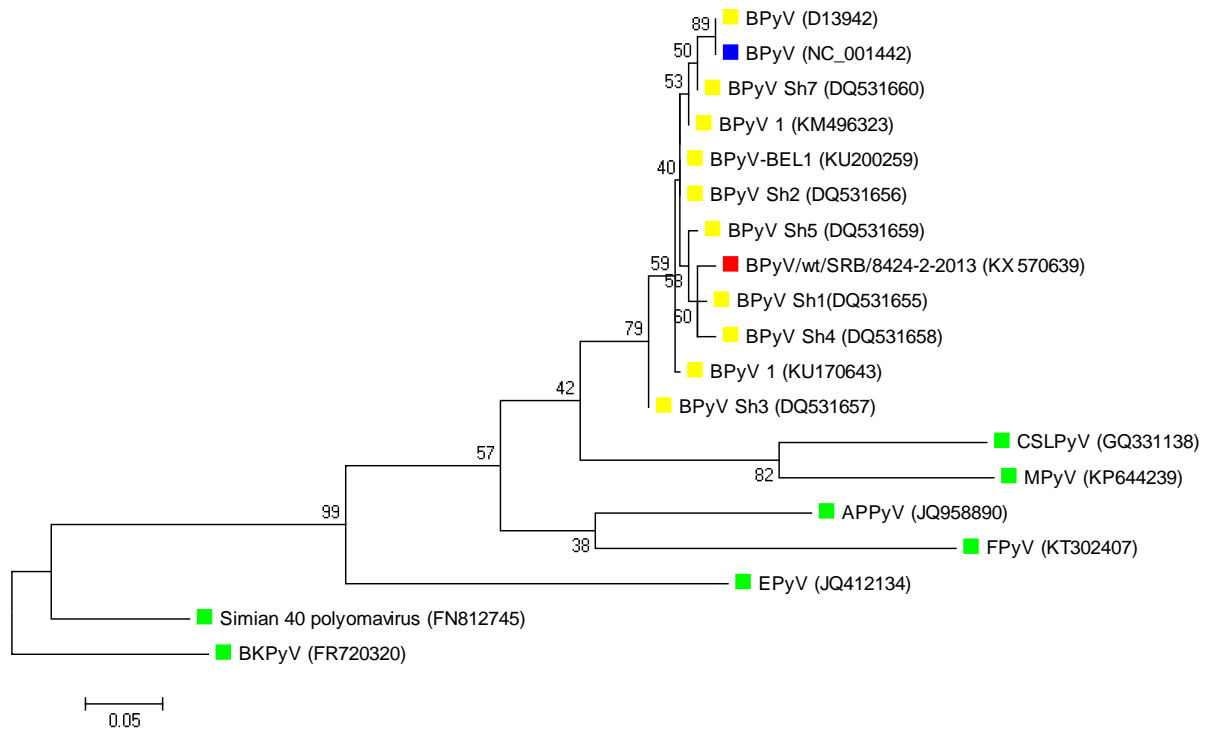


5.5.4 Rezultati sekvenciranja dela gena za protein kapsida BPyV

Sekvenciran deo genoma BPyV potiče iz uzorka reke Dunav sa plaže “Štrand” u Novom Sadu, uzorkovan u novembru 2014. godine i zaveden pod brojem 8424/2. Amplifikovan deo genoma capsid gena BPyV (VP1) je bio dužine 263 bp. Sekvenca genotipa BPyV sekvencirana u ovom istraživanju je deponovana u GenBank (Tab.15 u prilogu).

Nukleotidna sekvenca BPyV/wt/SRB/8424-2-2013 u dužini od 174 nukleotida je upoređena sa još 11 sekvenci BPyV iz GenBank sa 95-98% sličnosti i sa 8 sekvenci drugih tipova BPyV, a zatim je formirano filogenetsko stablo (Sl.70). Sekvenca BPyV/wt/SRB/8424-2-2013 je pokazala sličnost u 98% sa BPyV izolatom BEL1 (GenBank accession no. KU200259). Sličnost od 96 do 98% je bila i sa 6 sekvenci iz Španije (GenBank accession no. DQ531655, DQ531656, DQ531657, DQ531658, DQ531659, DQ531660). Pripadnost genotipu 1 sekvence BPyV je potvrđena i sa sličnošću sekvence 95-97% sa BPyV tipom 1 izolovanim iz limfnih čvorova krave u Kataloniji (GenBank accession no. KU170643) i u istom procentu sa referentnom sekvencom BPyV (GenBank accession no. NC_001442), kao i sekvencom BPyV tip 1 (GenBank accession no. D13942). U istom procentu sekvenca BPyV/wt/SRB/8424-2-2013 je bila slična sa BPyV sojem 1S5 (GenBank accession no. KM496323) izolovanog iz mlevenog mesa za hamburger u supermarketu u SAD.

Kako bi se dodatno potvrdila pripadnost sekvence iz Srbije genotipu 1 BPyV, ista je upoređena sa drugim vrstama/tipovima BPyV. U pitanju su sekvence tj. delovi genoma sojeva: *California sea lion polyomavirus 1* soj CSL6994 (GenBank accession no. GQ331138), *Meles meles polyomavirus 1* izolate UK (GenBank accession no. KP644239), *Artibeus planirostris polyomavirus 3* izolate A504 (GenBank accession no. JQ958890), *Finch polyomavirus* soj 1209 (GenBank accession no. KT302407), *Equine polyomavirus* izolate CU03 (GenBank accession no. JQ412134), *Simian virus 40* soj Ri257 (GenBank accession no. FN812745) i *BK polyomavirus* izolate RU15 (GenBank accession no. FR720320) (Sl.70).



Slika 70. Molekularna filogenetska analiza BPyV

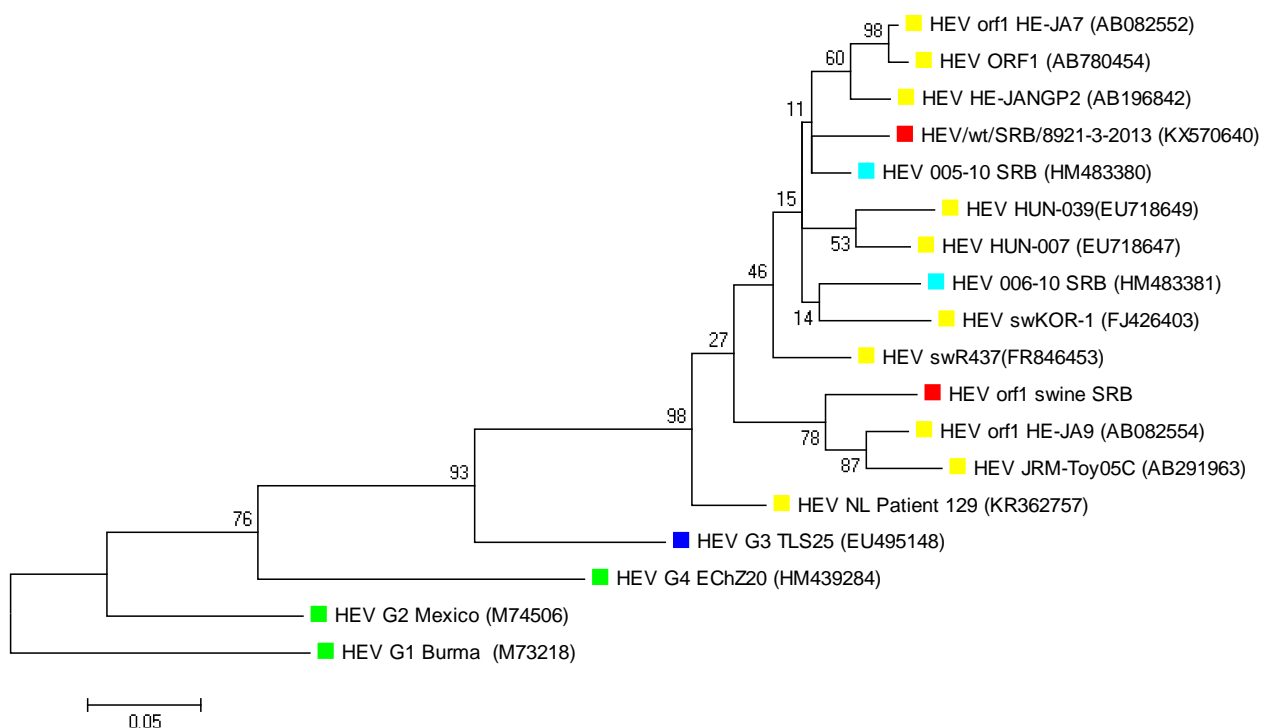
Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja. ■ nukleotidna sekvenca BPyV iz Srbije, ■ referentni izolat BPyV, ■ izolati BPyV tip 1 ■ izolati drugih tipova poliomavirusa; BKPvV je korišćen kao *outgroup*.

5.5.5 Rezultati sekvenciranja delova ORF1 i ORF2 HEV

Sekvenca genotipa HEV koji je sekvenciran u ORF1 delu genoma potiče iz uzorka reke Save u Sremskoj Mitrovici, nizvodno od izliva kanalizacije, uzorkovane u oktobru 2013. godine i zaveden pod brojem 8921/3. Drugi HEV deo genoma koji je sekvenciran u ORF1 delu genoma, koji je istovremeno služio i kao pozitivna kontrola detekcije virusa, potiče od uzorka žuči domaće svinje iz klanice u Novom Sadu. Umnoženi ORF1 deo genoma genotipa HEV je bio dužine 286 bp. Sekvenca HEV iz površinske vode sekvencirana u ovom istraživanju je deponovana u GenBank (Tab.15 u prilogu). Sekvenca genotipa HEV koja potiče od uzorka žuči domaće svinje je u postupku deponovanja u GenBank. Sekvence genotipa HEV ORF1 (HEV/wt/SRB/8921-3-2013 i HEV orf1 swine SRB) u dužini od 242 nukleotida su upoređene sa ukupno 13 sekvenci HEV iz GenBank sa sličnošću 89-95% i sa 3 sekvence drugih tipova HEV (G1, G2 i G4), a zatim je formirano filogenetsko stablo (Sl.71). Pripadnost HEV/wt/SRB/8921-3-2013 i HEV orf1 swine SRB sekvenci iz Srbije genotipu 3 je



potvrđena poređenjem ORF1 sekvenci sa referentnim izolatom HEV G3 (GenBank accession no. EU495148). Sekvenca HEV/wt/SRB/8921-3-2013 iz vode iz Srbije je pokazala sličnost u 95% sa ranije tipiziranim izolatom HEV 005-10 SRB iz Srbije, poreklom od domaćih svinja (GenBank accession no. HM483380). Sličnost u 94% je utvrđena sa izolatima HE_JA7 (GenBank accession no. AB082552) i izolatom HEV ORF1 (GenBank accession no. AB780454). Sličnost u 93% je utvrđena sa ranije tipiziranim HEV izolatom iz Srbije poreklom od domaće svinje (GenBank accession no. HM483381), izolatima iz Mađarske (GenBank accession no. EU718649, EU718647), izolatom HE-JANGP2 (GenBank accession no. AB196842) i izolatom HEV swR437 (GenBank accession no. FR846453). Izolat HEV poreklom od domaće svinje koji je istovremeno predstavljao i kontrolu detekcije virusa je pokazao sličnost u 93% sa izolatom HEV orf1 HE-JA9 (GenBank accession no. AB082554), a sličnost 89-92% je pokazao sa ostalim izolatima prikazanim u filogenetskom stablu (Sl.71). Kako bi se dodatno potvrdila pripadnost genotipu 3 ORF1 sekvence genotipa HEV iz Srbije su upoređene sa drugim genotipovima HEV tj. delovima genoma referentnih sojeva za dati genotip: HEV genotip 1 (G1) soj Burma, HEV G2 soj Mexico i HEV G4 izolat EChZ20 (Sl.71).



Slika 71. Molekularna filogenetska analiza HEV ORF1

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja. ■ nukleotidne sekvence HEV iz Srbije, ■ referentni izolat HEV G3 ORF1, ■ izolati HEV G3 ORF1 poreklom od domaćih svinja iz Srbije, ■ izolati HEV G3, ■ izolati drugih genotipova hepatitis E virusa; HEV G1 Burma je korišćen kao *outgroup*.



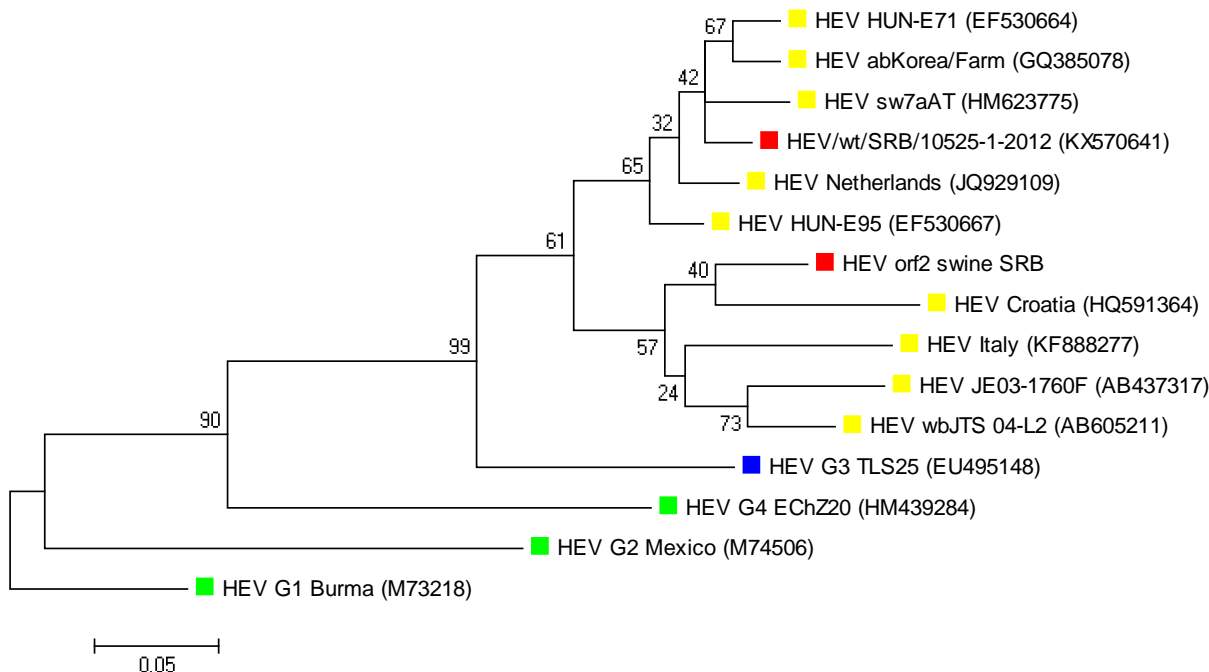
Detektovani HEV koji je sekvenciran u ORF2 delu genoma potiče iz uzorka reke Dunav u Novom Sadu, nizvodno od izliva kanalizacije GC-1, uzorkovan u decembru 2012. godine i zaveden pod brojem 10525/1. Druga HEV nukleotidna sekvenca ORF2 dela genoma HEV, koji je istovremeno služio i kao pozitivna kontrola detekcije virusa, potiče od uzorka žuči domaće svinje iz klanice u Novom Sadu.

Umnoženi ORF2 deo genoma detektovanog HEV je bio dužine 348 bp. Sekvenca HEV iz površinske vode sekvencirana u ovom istraživanju je deponovana u GenBank (Tab.15 u prilogu). Sekvenca virusa HEV koja potiče od uzorka žuči domaće svinje je u postupku deponovanja u GenBank.

Sekvence HEV ORF2 u dužini od 273 nukleotida su upoređene sa još 9 sekvenci HEV iz GenBank sa procentima sličnosti BLASTn 89-95% i sa 3 sekvence drugih genotipova HEV (G1, G2 i G4), a zatim je formirano filogenetsko stablo. Pripadnost HEV/wt/SRB/10525-1-2012 iz Srbije genotipu 3 je potvrđena poređenjem ORF2 sekvenci sa referentnim izolatom HEV G3 (GenBank accession no. EU495148) (Sl.72).

Nukleotidna sekvenca HEV/wt/SRB/10525-1-2012 iz vode iz Srbije je pokazala sličnost u 95% sa izolatima HEV poreklom od ljudi iz Holandije, Mađarske i izolatom poreklom od svinja iz Koreje (GenBank accession no. JQ929109, EF530664, GQ385078). Sličnost u 94% je utvrđena sa izolatima iz Mađarske poreklom od ljudi (GenBank accession no. EF530667) i izolatom HEV iz Austrije poreklom od svinja (GenBank accession no. HM623775). Sekvenca detektovanog HEV poreklom od domaće svinje koji je istovremeno predstavljao i kontrolu detekcije virusa je bila slična u 90% sa izolatom HEV poreklom od divlje svinje iz Japana (GenBank accession no. AB605211), a 89-90% sa izolatima iz Hrvatske i Italije poreklom od svinja (GenBank accession no. HQ591364, KF888277), kao i sa izolatom humanog porekla iz Japana (GenBank accession no. AB437317) (Sl.72).

Kako bi se dodatno potvrdila pripadnost genotipu 3 ORF2 sekvence HEV iz Srbije su upoređene sa drugim genotipovima HEV. U pitanju su sekvence tj. delovi genoma referentnih sojeva za dati genotip: Hepatitis E virus genotip 1 (G1) soj Burma (GenBank accession no. M73218), HEV G2 soj Mexico (GenBank accession no. M74506) i HEV G4 izolat EChZ20 (GenBank accession no. HM439284) (Sl.72).



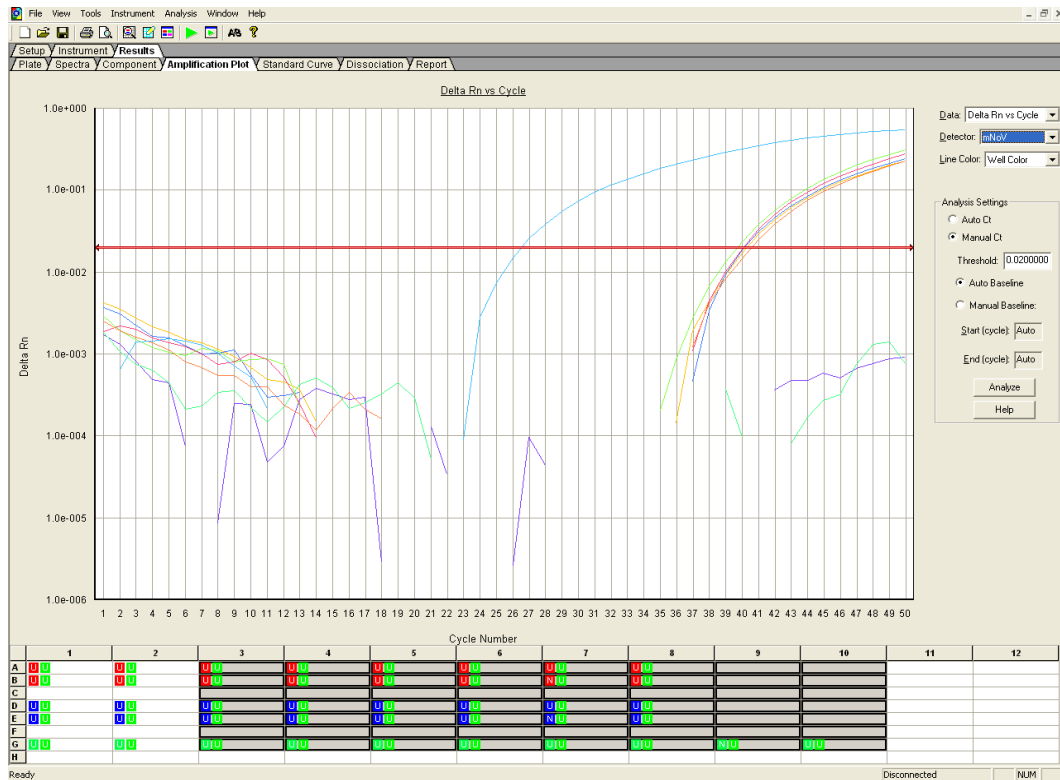
Slika 72. Molekularna filogenetska analiza HEV ORF2

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja; ■ nukleotidne sekvence HEV iz Srbije, ■ referentni izolat HEV G3 ORF2, ■ izolati HEV G3, ■ izolati drugih genotipova hepatitis E virusa; HEV G1 Burma je korišćen kao *outgroup*.

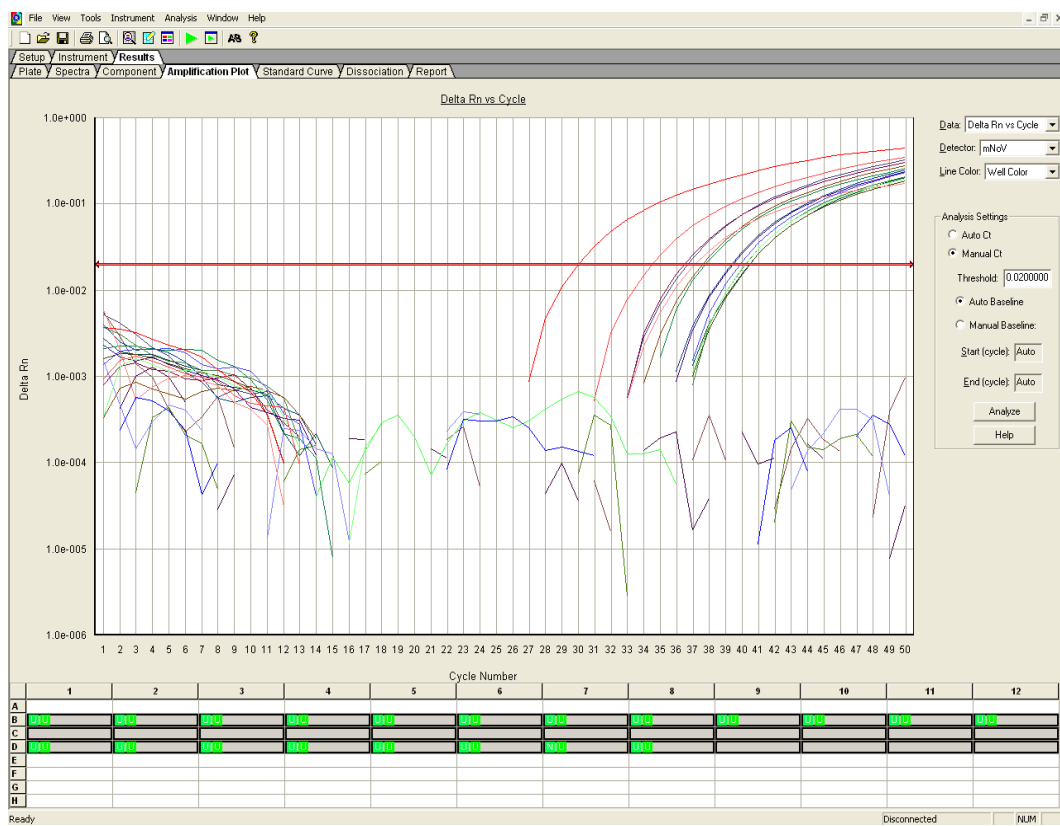
5.6 Kvantifikacija virusa u uzorku

U Tabeli 14. je prikazan izračunat broj PCR detektabilnih jedinica (PDU) virusa u 1L uzorka vode, sa intervalom pouzdanosti 95% (CI) (od minimalnog do maksimalnog broja PDU), po ispitanim površinskim vodama i uzorcima gradske kanalizacije. U uzorcima površinskih voda broj PDU/L se kretao od 48 (95% CI: 4-369) do $6,1 \times 10^3$ (95% CI: 406-70.9 $\times 10^3$), a u uzorcima gradske kanalizacije od 96 (95% CI: 8-477) do $6,1 \times 10^3$ (95% CI: 406-70.9 $\times 10^3$) (Tab.14).

Pre postupka koncentrovanja virusa u svaki uzorak vode je dodata procesna kontrola (MNoV) (10 μ l MNoV titra $10^6/10$ L uzorka vode), a zatim je nakon postupka detekcije za svaki detektovan uzorak izračunata njegova koncentracija i procenat prinosa, kao što je navedeno u delu Materijal i Metode. Jedan primer detekcije MNoV je dat na slici 73. „Recovery“ vrednost (procenat prinosa ispitivane karakteristike) metode se u ovom slučaju procenjuje iz razlike u koncentracijama dodate i detektovane procesne kontrole (MNoV) po uzorku (Sl. 74). Prinos reakcije za MNoV je iznosila od 2,16% do 21,3%.



Slika 73. Detekcija MNoV u uzorcima vode metodom Real-time RT-PCR



Slika 74. Detekcija MNoV u uzorcima vode metodom Real-time RT-PCR



Tabela 14. Najverovatniji broj PDU utvrđenih virusa u 1L ispitivanog uzorka površinske vode

	Mean PDU (95%CI)							
	HAdV	NoV GI	NoV GII	NoV GI	PAdV	BPyV	HEV	HAV
Dunav	48(4-369)-2,6x10 ³ (344-14x10 ³)	132(17-486)-960(81-3.5x10 ³)	132(17-486)-960(81-3.5x10 ³)	96(8-477)-960(81-3.5x10 ³)	96(8-477)-960(81-3.5x10 ³)	96(8-477)	96(8-477)	ND
Sava	48(4-369)-6,1x10 ³ (406-70,9x10 ³)	96(8-477)-264(34-730)	96(8-477)	264(34-730)	96(8-477)	96(8-477)	96(8-477)	ND
Begej	264(34-730)	96(8-477)	ND	132(17-486)	ND	ND	ND	ND
Krivaja	132(17-486)	96(8-477)	ND	132(17-486)	132(17-486)	ND	ND	ND
Tisa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Jegrička	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rakovački potok	ND	26(2-161)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Paličko jezero	1.3x10 ³ (172-4.8x10 ³)-6,1x10 ³ (406-70,9x10 ³)	96(8-477)-480(40-960)	264(34-730)	ND	ND	ND	ND	ND
Obedska bara	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DTD kanal	480(40-960)	264(34-730)-960(81-3.5x10 ³)	96(8-477)	264(34-730)	ND	ND	ND	ND
Veliki Bački kanal	480(40-960)	960(81-3.5x10 ³)	96(8-477)-1.3x10 ³ (172-4.8x10 ³)	ND	ND	ND	ND	ND
KCIII kanal	480(40-960)	264(34-730)-960(81-3.5x10 ³)	4800 (409-38,4x10 ³)	ND	ND	96(8-477)	ND	ND
GK Subotica	1.3x10 ³ (172-4.8x10 ³)	96(8-477)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GK Sombor	ND	96(8-477)	ND	ND	96(8-477)	ND	ND	ND
GK Odzaci	6,1x10 ³ (406-70.9x10 ³)	264(34-730)-2,6x10 ³ (344-14x10 ³)	96(8-477)-960(81-3.5x10 ³)	ND	ND	ND	ND	ND

Legenda: Mean – srednja vrednost; PDU – PCR detektabilna jedinica (PCR detectable unit); CI – Interval pouzdanosti (Confidence interval); GK - gradska kanalizacija; ND – virus nije detektovan niti u jednom ispitivanom uzorku



6 DISKUSIJA



Prisustvo virusa životinja i ljudi u površinskim, naročito vodama za rekreaciju, predstavlja veliki problem za javno zdravlje, kao i ekonomski problem (Bofill-Mas i sar, 2010). Za površinske vode glavni izvor kontaminacije virusima je kanalizaciona voda iz urbanih područja (Maalouf i sar, 2010). Pored toga, spiranje vode sa zemljišta izazvano obilnim padavinama ili topljenjem snega može doprineti zagađenju površinskih voda virusima (Silva i sar, 2011). Virusi životinja i ljudi mogu dospeti i u podzemne vode. Bez obzira na to da li su izvor vode za piće kontaminirane podzemne ili površinske vode, one mogu dovesti do epidemija širokih razmera (Okoh i sar, 2010). Izvor infekcije mogu biti i vode koje se koriste u rekreativne svrhe, ali i vode za navodnjavanje i ispiranje povrća i voća, koje su možda i najčešći uzrok epidemija enteričnih virusa. Brojne studije su potvrdile da je uzrok epidemija gastroenteritisa i hepatitisa bilo konzumiranje zelene salate, bobičastog voća i slično, koji su bili kontaminirani virusima (Okoh i sar, 2010).

U Srbiji, voda za piće, površinske, podzemne i vode za rekreaciju se kontrolišu sa sanitarnog aspekta uglavnom samo na prisustvo bakterioloških pokazatelja. Netretirana gradska kanalizacija i različite otpadne vode se u našoj zemlji najčešće izlivaju direktno u površinske vode. Postrojenja za tretman otpadnih voda u Srbiji je veoma malo, i ukoliko postoje, u nekim gradovima često ne rade punim kapacitetom. Samo nekoliko postrojenja za tretman su izgrađena u poslednjih nekoliko godina. Brojna istraživanja u svetu su pokazala da je utvrđeno prisustvo mnogih virusa i u uzorcima nakon tretmana prečišćavanja, koje se ulivaju u površinske vode ili se koriste kao izvor vode za piće. Zbog ovakve situacije, jedan od zadataka ovog istraživanja bio je da se utvrdi u kojoj meri su površinske vode u Srbiji kontaminirane virusima životinja i ljudi.

6.1 Prisustvo i raširenost HAdV u površinskim i kanalizacionim vodama

6.1.1 Prevalenca HAdV u površinskim vodama

Tokom poslednjih godina sve više pažnje se usmerava na virusološki kvalitet otpadnih kanalizacionih voda zbog povećanog rizika od virusnih oboljenja koja se prenose vodom (Wieczorek i sar, 2015). Od 1998. godine Agencija za zaštitu životne sredine iz SAD (EPA) je



uključila adenoviruse u listu kontaminanata vode za piće, ukazujući da su ovi virusi potencijalno uzroci za hidrične epidemije (Barardi i sar, 2012).

Humani adenovirusi mogu biti prisutni u uzorcima površinskih voda kontaminiranim ljudskim fecesom. Razlog pojave adenovirusa ljudi u prirodnim vodenim sredinama je najčešće kontaminacija netretiranom ili neadekvatno tretiranom gradskom kanalizacionom vodom. Humani adenovirusi koji se nalaze u kanalizacionim uzorcima klanica svinja i pilića su najverovatnije prisutni usled kontaminacije ljudskom kanalizacijom, odnosno fekalijama (Pina i sar, 1998; Jiang i sar, 2006; Wei i sar, 2009). Tokom ovog istraživanja prisustvo HAdV je utvrđeno u 42,4% (42/99) uzoraka površinskih voda. Humani adenovirus je detektovan na svim lokalitetima reke Dunav, osim u lovištu „Plavna“. Na tri lokaliteta reke Dunav (GC-1, GC-2 i u Pančevu) voda je uzorkovana nizvodno od izliva kanalizacije. Ovim rezultatima je potvrđeno da je HAdV bio prisutan u kanalizaciji i da su ostali pozitivni uzorci reke Dunav za koje nije postojao konkretan podatak o izlivu otpadnih voda, najverovatnije bili kontaminirani fekalnim otpadom. Takođe, u uzorcima iz reke Krivaje, koja teče pored nekoliko farmi životinja i koja je uzorkovana baš na tim lokalitetima, HAdV je detektovan u 3 od 5 uzoraka. Ovakvi rezultati su takođe ukazali da je u blizini farmi životinja površinska voda najverovatnije kontaminirana fekalijama poreklom od ljudi. U uzorcima nizvodno od izliva gradske kanalizacije u rekama Begej i Sava i Velikog Bačkog i KCIII kanala takođe je detektovan HAdV. Ovi rezultati predstavljaju prve nalaze humanog adenovirusa u površinskim vodama u Srbiji. Humani adenovirusi su na internacionalnom nivou predloženi za indikatore prisustva virusnih patogena ljudi u životnoj sredini i koriste se kao marker virusi fekalne kontaminacije poreklom od ljudi, zbog njihove stabilnosti u životnoj sredini (Bofill Mas i sar, 2006; Silva i sar, 2011).

Takođe, rezultati su pokazali da se korišćene metode koncentrovanja HAdV u uzorcima vode i molekularne metode detekcije ovog virusa, mogu uspešno primenjivati za utvrđivanje prisustva ovog virusa u površinskim vodama. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima mnogih drugih studija sprovedenih širom sveta. U istraživanju sprovedenom u susednoj Mađarskoj HAdV su detektovani metodama PCR i Real-time PCR u 56% uzoraka površinskih voda (Kern i sar, 2013). U drugoj studiji sprovedenoj u Mađarskoj, visok nivo fekalne kontaminacije poreklom od životinja i ljudi, zabeležen je u reci Tisi (Rusinol i sar, 2014). Reka Tisa je jedna od glavnih reka u Centralnoj Evropi, koju karakterišu sezonske poplave u rano proleće i početkom leta. Iako visoki vodostaji reke utiču na razblaživanje



fekalne kontaminacije, postoji značajan rizik za stanovništvo, jer je u tom istraživanju HAdV utvrđen u svim ispitanim uzorcima, tokom svih sezona uzorkovanja (Rusinol i sar, 2014). Istraživanjem u Španiji je utvrđena veća prevalenca HAdV (65,0%) nego u ovoj disertaciji, ali su u tom slučaju testirani samo uzorci vode iz reka koje su imale različite nivoe fekalnog zagađenja (Pina i sar, 1998). Kao i u ovom radu, prisustvo HAdV je ispitivano u površinskim vodama i vodama za piće u mnogim drugim zemljama u svetu. Humani adenovirus je detektovan u uzorcima voda sa prevalencom od 25,0% do 75,0% u Južnoafričkoj Republici, Koreji, Brazilu, Singapuru (Lee i sar, 2004, 2005; Silva i sar, 2010; Aw i Gin, 2011; Chigor i Okoh, 2012a). U istraživanju Kokkinos i sar. (2012) metodom real-time PCR je utvrđeno da je prevalenca HAdV u vodi za navodnjavanje iznosila 27,9%, u salati kao sirovom proizvodu 26,4% i u đubrivu 60,0%. Ova studija je potvrdila mogućnost virusne kontaminacije povrća i postojanje rizika za zdravlje ljudi, kao i na značaj marker virusa za utvrđivanje fekalne kontaminacije u vodi i hrani. Rezultati u istraživanju ovih autora su istovremeno ukazali i na uspešnost korišćenja molekularnih metoda za detekciju virusa u vodi i hrani. Interesantno je spomenuti da su rezultati detekcije HAdV na agaroznom gelu dali jasne rezultate potvrde molekularnih metoda (qPCR) u ovoj disertaciji, osim u jednom uzorku koji je bio ispod limita detekcije konvencionalnog PCR testa. Pomenuti uzorak je pokazao visoku vrednost Ct u qPCR testu, odnosno prisustvo veoma malog broja virusnih čestica, što može biti razlog negativnog rezultata ovog uzorka PCR testom. Takođe, s obzirom da je u brojnim literaturnim podacima potvrđena manja osetljivost PCR testa u odnosu na qPCR, to se može smatrati još jednim razlogom takvih rezultata za HAdV. Šest produkata HAdV je sekvencirano i tipizirano, što je dodatno potvrdilo uspešnost metode.

U ovoj disertaciji od ukupno 21 uzorak površinskih voda koje se koriste za rekreaciju, uzorkovane na mestima javnih kupališta od juna 2013. do juna 2014. godine, u 8 (38,1%) je utvrđeno prisustvo humanog adenovirusa. Ovi rezultati predstavljaju prva istraživanja prisustva HAdV u Vojvodini (Srbiji). Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje rizika za zdravlje ljudi i potrebu za redovnim praćenjem i izveštavanjem o stanju kontaminacije voda koje se koriste za rekreativne svrhe i sa virusološkog aspekta. Nešto kasnije, na postojanje rizika za javno zdravlje ukazalo je još jedno istraživanje u Vojvodini, u avgustu i septembru 2014. godine, u kojem je u ukupno 90 uzoraka sa 5 gradskih plaža u Vojvodini prisustvo humanog adenovirusa utvrđeno u 67,0% uzoraka. U ukupno 18 uzoraka vode sa lokaliteta plaže Štrand u Novom Sadu, humani adenovirus je detektovan u 12 uzoraka (Jovanovic-



Galovic i sar, 2016). Veća prevalenca HAdV u tom istraživanju u odnosu na rezultate o ovoj disertaciji je najverovatnije zbog većeg broja uzoraka sa gradskih plaža, jer su u tom istraživanju testirani samo uzorci vode koja se koristi u rekreativne svrhe. Takođe, voda u istom istraživanju je uzorkovana samo tokom kupališne sezone, dok je u ovoj disertaciji obuhvaćeno ispitivanje više različitih površinskih i kanalizacionih voda u tri različite sezone u toku 2 godine koliko je trajalo ispitivanje. Prevalenca virusa u površinskim voda zavisi i od statusa infekcije u populaciji ljudi u periodu uzorkovanja, što može biti još jedan razlog utvrđivanja veće prevalencije u datom istraživanju, u odnosu na rezultate u ovoj disertaciji. Slična istraživanja su rađena i u svetu. Silva i sar. (2011) detektovali su HAdV u 44,4% (24/54) uzoraka prikupljenih iz reka i jezera koje se koriste za rekreaciju i kao izvor vode za piće u gradu Goiania u Brazilu. U ukupno 132 uzorka sveže i morske vode koje se koriste za rekreaciju, prikupljenih sa 24 različite lokacije u devet različitih evropskih zemalja analizirano je prisustvo HAdV (Bofill-Mas i sar, 2010). U 15 laboratorija iz tih devet evropskih zemalja analizirano je prisustvo HAdV metodom real-time PCR i u 60,6% uzoraka je detektovan HAdV. Najčešće je bio prisutan HAdV serotip 41. Takođe, utvrđeni su i serotipovi: 12, 19, 31 i 40 (Bofill-Mas i sar, 2010). U jednoj studiji u Južnoafričkoj Republici, na prisustvo HAdV analizirano je ukupno 93 uzorka iz 3 bazena koja se koriste za rekreaciju. Humani adenovirus je detektovan u 26 (15,4%), 38 (21,1%) i 28 (10,7%). Iako su HAdV detektovani, nije bilo prijava infekcije ovim virusom od strane kupača, ali se ovakvi slučajevi u Južnoafričkoj Republici obično i ne prijavljuju. U ovom slučaju, na osnovu dobijenih rezultata autori su ukazali da rizik od infekcije humanim adenovirusom svakako postoji (van Heerden i sar, 2005). U Francuskoj, u Novoj Kaledoniji koja je veoma popularna za rekreativne aktivnosti, na lokalitetima gde je morska voda opterećena izlivima otpadne kanalizacione vode, uzorkovana je morska voda svakog meseca tokom jedne godine. U ovim uzorcima metodom real-time PCR utvrđeno je prisustvo HAdV u 67,0% uzoraka. Ova studija je, kao i istraživanja u ovoj disertaciji, ukazala na važnost redovnog monitoringa, kao i na potrebu izgradnje postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda koje bi u mnogome smanjilo kontaminaciju morske vode otpadnim kanalizacionim vodama (Kaas i sar, 2015). Silva i saradnici su u istraživanju tokom 2011. godine dokazali da je HAdV pokazao sezonski karakter u pojavi u površinskim vodama. Nešto drugačiji rezultati dobijeni su za ispitivanja reke Vieprz iz Poljske tokom 2007. godine, gde je HAdV detektovan metodom nested PCR u 28,3% od ukupno 60 ispitanih uzoraka vode, ali je utvrđeno prisustvo virusa tokom svih



sezona u toku jedne godine (Kozyra i sar, 2011). U istraživanjima koje obrađuje ova disertacija, utvrđeno je prisustvo HAdV u površinskim vodama i gradskoj kanalizacionoj vodi tokom svih sezona. Tokom zime 2012. godine HAdV je detektovan u reci Dunav u 88,9% (8/9) uzoraka. U sezoni leto 2013. godine utvrđeno je prisustvo HAdV u 45,5% (15/33) uzoraka, tokom sezone jesen/zima 2013. godine taj broj je iznosio 39,4% (13/33) uzoraka, a tokom proleća HAdV je detektovan u 30,3% (10/33) uzoraka. Ovi rezultati su u skladu sa drugim sličnim istraživanjima u svetu i ukazuju da se HAdV može naći u površinskim vodama na području Vojvodine tj. Srbije tokom cele godine. Rusinol i sar. (2014) su takodje pokazali da je HAdV detektovan na svim ispitanim lokalitetima i u svim sezonama u toku jedne godine.

Prevalenca HAdV u ovom istraživanju ukazuje na neophodnost monitoringa ovog virusa u površinskim vodama. Takođe, prevalenca HAdV u ovom radu ukazuje na povećanu potrebu za podizanje postrojenja za prečišćavanje otpadnih kanalizacionih voda na svim mestima gde ona ne postoje, kao i na sistemskom praćenju učinka prečistača tamo gde oni postoje. U maju mesecu, kada su neka područja u Srbiji bila pogođena poplavama, od 30 lokaliteta na kojima je uzorkovana površinska voda, tri lokaliteta su bila poplavljena. U pitanju su reka Sava u Sremskoj Mitrovici na plaži i nizvodno od izliva kanalizacije, kao i Obedska bara u Obrežu. Sa ovih lokaliteta je voda uzorkovana u junu 2014. godine, kada je nakon poplava došlo do opadanja vodostaja. Uzorak reke Save na plaži je u ovom uzorkovanju bio negativan na prisustvo HAdV, dok je u prethodne dve sezone uzorkovanja bio pozitivan. U uzorku nizvodno od izliva kanalizacije je i ovog puta detektovan HAdV. Takođe, u uzorku iz Obedske bare nije detektovan HAdV, kao ni u prethodna dva uzorkovanja. U ovom slučaju, u odnosu na uzorkovanu površinsku vodu (Reku Savu) i prethodna uzorkovanja, došlo je do promene samo u jednom uzorku u kom nakon poplave nije detektovan virus. Jedan od razloga može biti veća koncentracija inhibitora qPCR reakcije u uzorku vode koja je utvrđena nakon opadanja vodostaja posle poplave.

U ovom istraživanju HAdV nije detektovan u 12 od 30 uzoraka površinskih voda, kao i u jednom od 9 uzoraka gradske kanalizacije. U parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, kao i u SRP Obedska bara nije detektovan humani adenovirus, što je bilo očekivano, jer je na ovim lokalitetima antropogeni uticaj znatno manji.



6.1.2 Prevalenca HAdV u kanalizacionim vodama

Prisustvo HAdV u kanalizacionoj vodi a samim tim i u životnoj sredini tj. površinskim vodama odražava infektivni status stanovništva i predstavlja rizik po javno zdravlje (Wieczorek, 2015). Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije u 4 (44,4%) je detektovan HAdV. Uzorak gradske kanalizacije u Odžacima je bio pozitivan na prisustvo HAdV samo u sezoni uzorkovanja leto 2013. godine. Influent kanalizacije u Subotici je ukazao na prisustvo HAdV u svim sezonama uzorkovanja. U uzorcima influenta kanalizacije u Somboru nije utvrđeno prisustvo HAdV niti u jednom uzorku, dok su sva tri uzorka efluenta kanalizacije iz Sombora bila pozitivna na prisustvo ovog virusa. Ovakvi rezultati su ukazali na to da je mesto za uzorkovanje influenta kanalizacije najverovatnije neodgovarajuće, jer je u pitanju bazen kroz koji otpadna voda teče velikom brzinom. Humani adenovirus je najverovatnije bio prisutan sve vreme u kanalizacionoj vodi ali ne homogeno, nego povremeno u odnosu na sam tok kanalizacije, jer je detektovan u efluentu nakon prečišćavanja kada je cela vodena masa kanalizacione vode homogenizovana. Moguće je, prema tome, da zbog takve konfiguracije bazena za influent dodje do lažno negativnog rezultata, pa je preporučljivo ubuduće uzimati veću količinu uzorka u skladu sa konfiguracijom bazena za influent.

Prevalenca HAdV u ovoj disertaciji je veoma slična prevalenci u drugim istraživanjima sprovedenim u drugim zemljama. U Grčkoj nije u potpunosti razvijen nadzor nad ovim virusima i studija u kojoj je prevalenca HAdV bila 45,8% je ukazala na potrebu monitoringa HAdV kao veoma bitnog za epidemiološki nadzor gastroenteritisa (Kokkinos i sar, 2011). Slična istraživanja su rađena i u Nemačkoj, Poljskoj, Japanu gde je prevalenca HAdV bila 56,0%-100,0% (Pusch i sar, 2005; Katayama i sar, 2008; Wieczorek i sar, 2015).

U istraživanju sprovedenom u ovom radu, u 6 uzoraka u gradovima Subotica i Sombor, nakon tretmana prečišćavanja humani adenovirus je detektovan u svim uzorcima (100,0%) u svakoj sezoni uzorkovanja. Ovo ukazuje na neodgovarajući tretman kanalizacionih voda u postrojenjima sa virusološkog aspekta, kao i na neophodnost sistemskog praćenja virusa u uzorcima efluenta. Naime, upravo se tretirana voda ispušta u recipijente koji veoma često mogu biti vode koje se koriste za rekreaciju, pa samim tim postoji povećan zdravstveni rizik. Ovakvi rezultati su u skladu sa istraživanjima drugih autora. Metodom real-time PCR, u gradu Porto Alegre u Brazilu, HAdV je detektovan u dva od osam (25,0%) uzoraka influenta



i četiri od osam (50,0%) uzoraka efluenta iz sistema za prečišćavanje gradske kanalizacione vode. Ovakav slučaj utvrđivanja veće prevalence u tretiranoj vodi u odnosu na sirovu kanalizaciju je zapažen i u drugim studijama širom sveta (He i Jiang, 2005; Fong i sar, 2010), što može biti izazvano većom koncentracijom PCR inhibitora u kanalizacionoj vodi (Dalla Vecchia i sar, 2012). Brojna istraživanja su pokazala da HAdV ipak mogu da opstanu u tretiranoj otpadnoj vodi i da njihova ponovna upotreba u industriji i poljoprivredi ili njihovo ispuštanje u površinske vode koje se koriste za rekreaciju mogu izložiti ljude opasnosti. Takva istraživanja su rađena u Italiji, Brazilu, Maroku, Južnoafričkoj republici (Maluquer de Motes i sar, 2004; Carducci i sar, 2009; La Rosa i sar, 2010; Amdioune i sar, 2012; Fumian i sar, 2013; Osuolale i Okoh, 2015).

U severoistočnoj Grčkoj je od decembra 2004. do novembra 2006. godine posredno utvrđivano prisustvo humanog adenovirusa u zajednici, određivanjem prisustva ovog virusa u uzorcima kanalizacije iz 6 postrojenja za tretman gradskih kanalizacionih otpadnih voda. Ovakav koncept se pokazao kao dosta pouzdan. Humani adenovirusi su detektovani u 59,7% uzoraka, a genotipizacijom je potvrđen HAdV tip 41 (Parasidis i sar, 2013b). Na osnovu rezultata detektovanih HAdV u površinskim vodama i uzorcima gradske kanalizacione vode u ovom istraživanju od oktobra 2012. do juna 2014. godine možemo indirektno potvrditi da je HAdV cirkulisao u populaciji ljudi na području Vojvodine. Ovi rezultati su potvrđeni detekcijom HAdV u 45,0% uzoraka stolice u rutinskom virusološkom ispitivanju na teritoriji Severnobačkog okruga, kao i 5 prijavljenih slučajeva u 2014. godini (Ilic i Markovic, 2013; Ilic i Strbac, 2015). U Vojvodini tokom pet godina serološki je pregledano 660 dece sa akutnim infekcijama gornjih delova respiratornog trakta, 260 dece sa znacima bronhitisa, 660 dece obolele od pneumonije, 560 dece sa mononukleoznim sindromom, 1170 osoba različite starosti sa limfadenopatijom i 780 osoba različite starosti sa gripoznim sindromom, kako bi se utvrdila učestalost raznih bolesti izazvanih adenovirusima. Adenovirusi su detektovani kod 34,2% pregledane dece sa akutnom infekcijom gornjih delova respiratornog trakta, kod 32,7% ispitanika sa bronhitisom, 35,8% dece sa mononukleoznim sindromom i kod 26,7% obolele dece sa pneumonijom (Jerant Patić i sar, 2009). Pomenuta istraživanja potvrđuju da su HAdV široko rasprostranjeni u humanoj populaciji na teritoriji koja je ispitivana u okviru ovog rada, tako da se i nalazi HAdV u površinskim vodama na području Vojvodine uklapaju u epidemiološku situaciju na pomenutom području.



6.1.3 Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih HAdV

Sekvencirani delovi genoma HAdV u ovoj disertaciji potiču iz 6 uzoraka: dve gradske kanalizacije (u gradovima Subotica i Odžaci), 2 uzorka vode jezera Palić nakon tretmana prečišćavanja, uzorka reke Dunav u Novom Sadu nizvodno od izliva gradske kanalizacije i uzorka Velikog Bačkog kanala u Vrbasu. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom je potvrđeno da sve sekvence detektovanog HAdV pripadaju grupi F HAdV. Tri sekvence pripadaju tipu 40, a ostale tipu 41. Sedmak i sar. (2007) su dokazali da postoji veza, odnosno sličnost između virusa u životnoj sredini i virusa izolovanog iz kliničkog materijala u datoj godini i u određenim geografskim oblastima. Dominantan klinički izolat je najčešće bio dominantan izolat u kanalizacionoj vodi tokom ispitivane godine. Ovi rezultati su ukazali da je tipizacija virusa prisutnih u kanalizaciji i životnoj sredini veoma bitna za prevenciju, kao i osnova za razvoj vakcina, ali i uvid u pojavu novih serotipova (Fong i sar, 2010). U Južnoafričkoj Republici adenovirusi tip 40 i 41 su najčešće izolovani iz uzoraka tretirane vode za piće i rečne vode, što je u skladu sa rezultatima ove studije. U SAD, najzastupljeniji su tipovi 3, 2, 1 i 5. U nekim studijama je potvrđeno da je adenovirus tip 41 postepeno zamenio serotip 40 kao dominantni serotip izolovan od pacijenata sa gastroenteritisom i bio je identifikovan kao najprisutniji serotip u otpadnim vodama (Sedmak i sar, 2003; van Heerden i sar, 2005; Fong i sar, 2010).

Tri sekvence HAdV iz uzoraka vode u ovom istraživanju označenih brojevima 1, 5 i 6, pripadaju HAdV tipu 40, na osnovu identičnosti sekvenciranog dela genoma sa HAdV F/HAdV 40 izolatom koji su prijavili Davison i sar. (1993). Takođe, sekvenca je bila identična referentnom soju Dugan iz Škotske, kao i soju Dugan iz Japana (Toogood i sar, 1989; Ishiko i sar, 2008). Humani adenovirus tip 40 je prvi put izolovan 1975. godine iz uzorka stolice i od tada je dokazano njegovo učešće u etiologiji akutnog infantilnog gastroenteritisa. Sekvenca iz Srbije je bila potpuno identična sa izolatom HAdV iz vode u Japanu, kao i sa sekvencom HAdV izolata Hovix u Švajcarskoj (Devakirubakaran i Senthilkumar, 2015; Pacesa i sar, 2016). Tri sekvence HAdV iz uzoraka vode označenih brojevima 2, 3 i 4 pripadaju HAdV tipu 41 i pokazale su 100% sličnosti sa sekvencom HAdV izolovanog iz vode u Japanu (Devakirubakaran i Senthilkumar, 2015), izolatom RJ/2013-22188 odgovornog za epidemije gastroenteritisa u Rio de Ženeiru (Portes i sar, 2015) i sekvencom HAdV 41 izolat



NY/2010/4849 poreklom iz SAD-a (Lamson i sar, 2014). Takođe, pripadnost detektovanih sekvenci tipu 41 potvrđena je i na osnovu sličnosti sekvenci sa referentnim sojevima virusa (Toogood i Hay, 1988; Ishiko i sar, 2008). Detektovane sekvence tipova 40 i 41 iz ovog rada su veoma slične sa virusnim sojevima iz udaljenih zemalja, što ide u prilog veoma široke rasprostranjenosti određenih sojeva HAdV. Takođe, u pitanju je relativno stabilan dsDNK virus, koji znatno sporije akumulira mutacije. Jedan od razloga veoma velike sličnosti sa izolatima iz udaljenih zemalja je i da nema ili ima veoma malo prijavljenih izolata iz bližeg okruženja Srbije, ni iz kliničkih uzoraka, niti iz uzoraka životne sredine.

Pripadnost detektovanih sekvenci HAdV iz Srbije grupi F i tipovima 40 i 41, dodatno je potvrđena filogenetskom analizom HAdV sekvenci.

6.2 Prisustvo i raširenost NoV u površinskim i kanalizacionim vodama

Norovirusi su humani patogeni koji se prenose vodom i hranom. Prijavljene su brojne epidemije uzrokovane norovirusima iz fekalno kontaminirane vode za piće i vode koja se koristi za rekreaciju, što je najčešće posledica ulivanja neadekvatno tretirane otpadne vode u njih i sposobnosti preživljavanja ovog virusa u životnoj sredini (Hoebe i sar, 2004; Lodder i de Roda Husman, 2005; Maunula i sar, 2005; Skraber i sar, 2005; van den Berg i sar, 2005; Da Silva i sar, 2007; Rodriguez-Lazaro i sar, 2012).

6.2.1 Prevalenca NoV u površinskim vodama

Voda za piće i rekreaciju u razvijenim zemljama je uglavnom čista. Zagađenje se javlja retko, najčešće kao posledica izlivanja otpadnih voda ili septičkih jama, kao posledica poplava ili velikih padavina. Takva zagađenja su najčešće povezana sa epidemijama gastroenteritisa izazvanog norovirusima (Allen i sar, 2013). Niska infektivna doza, otpornost na dezinfekciju i različiti putevi prenošenja su razlozi za visoku učestalost norovirusa u populaciji ljudi i u životnoj sredini. Prisustvo NoV je potvrđeno u gradskoj kanalizacionoj vodi i površinskim vodama u mnogim studijama širom sveta (Lodder i de Roda Husman, 2005; Parasidis i sar, 2013a).



U ovom istraživanju utvrđeno je prisustvo NoV u 55,6% (55/99) uzoraka površinskih voda. Prevalenca NoV GII je iznosila 40,4%, a NoV GI je 15,2% u ispitanim površinskim vodama. Prisustvo NoV GII je utvrđeno na 5 lokaliteta reke Dunav, dva lokaliteta reke Krivaje, dva lokaliteta DTD kanala, dva lokaliteta reke Sava i na lokalitetima reke Begej, Rakovačkog potoka, Velikog bačkog i KCIII kanala. Norovirus GI je detektovan na 5 lokaliteta reke Dunav i na po jednom lokalitetu DTD kanala, jezera Palić, reke Save, Velikog Bačkog kanala i KCIII kanala. Na većini ovih lokaliteta je uzorkovanje izvršeno nizvodno od izliva kanalizacije, pa su ti izlivi kanalizacije verovatno i direktni uzročnici detekcije NoV, dok je kod ostalih uzoraka NoV prisutan kao rezultat fekalne kontaminacije iz udaljenih izvora ili na drugi način (npr. spiranjem kontaminiranog tla). Ovi rezultati predstavljaju prve nalaze norovirusa u površinskim vodama u Vojvodini (Srbiji), jer do sada nisu pronađeni dostupni publikovani podaci. Takođe, rezultati sprovedenih istraživanja su pokazali da se korišćene metode koncentrovanja NoV u uzorcima vode i molekularne metode detekcije mogu uspešno primeniti u monitoringu prisustva ovog virusa u površinskim vodama. Rezultati istraživanja u ovoj disertaciji su u skladu sa rezultatima drugih studija sprovedenih u zemljama u okruženju Srbije, ali i širom sveta. U studiji sprovedenoj u Mađarskoj, norovirusi su detektovani u 30% uzoraka ispitanih površinskih voda metodom real-time RT-PCR (Kern i sar, 2013). Takođe, prisustvo NoV GI i GII u površinskim i kanalizacionim vodama, ali i u morskim i podzemnim vodama je potvrđeno i u Francuskoj, Poljskoj, Keniji, Brazilu, SAD, Singapuru a prevalenca je bila od 9,3% do 71,7%. Kao i rezultati u ovoj disertaciji, ova istraživanja su ukazala na to da je metoda real-time RT-PCR veoma korisna za monitoring ovog virusa u površinskim vodama, naročito u zemljama u kojima se kanalizacija ispušta u reke i jezera bez ikakvog tretmana, što dovodi do loših sanitarnih uslova i izvora infekcije za stanovništvo (Lodder i de Roda Husman, 2005; Aw i sar, 2009, Hill i sar, 2010; Aw i sar, 2011; Kozyra i sar, 2011; Kiulia i sar, 2014; Teixeira i sar, 2015). Konvencionalni RT-PCR test za NoV, koji je rađen u disertaciji radi dobijanja produkta za sekvenciranje, potvrdu i tipizaciju detektovanog virusa, je potvrdio prisustvo svih testiranih NoV koji su bili detektovani i RT-qPCR metodom. Neke trake pozitivnih uzoraka su bile slabo vidljive na agaroznom gelu što je posledica visoke Ct vrednosti u RT-qPCR testu, odnosno male brojnosti virusnih čestica u uzorku. S obzirom da je u brojnim literaturnim podacima potvrđena manja osetljivost RT-PCR testa u odnosu na RT-qPCR, to se može smatrati još jednim razlogom takvih rezultata za NoV. Kod tri uzorka NoV na agaroznom gelu nije



uočena pozitivna reakcija kada su ispitivani kao nerazređeni ekstrakti nukleinskih kiselina, ali kada su ekstrakti nukleinskih kiselina razblaženi 10^{-1} , tada su dali pozitivnu reakciju, a samim tim su smatrani pozitivnim nalazom. Dva uzorka NoV su sekvencirana i time je takođe potvrđena uspešnost metode.

U ovoj disertaciji tokom zime 2012. godine do juna 2014. godine NoV GII je detektovan u uzorcima površinskih voda u svim sezonama uzorkovanja sa prevalencom od 23,3% do 88,9%. Takođe, NoV GI je detektovan u uzorcima u svim sezonama uzorkovanja u ovoj disertaciji, sa prevalencom 3,3% do 26,7%. Ovi rezultati su indirektno potvrdili da je NoV bio prisutan u populaciji ljudi tokom cele godine. U istraživanju Kozira i sar. (2011) iz reke Wieprz tokom 2007. godine, norovirusi su detektovani u 11,6% od 60 ispitanih uzoraka tokom letnjeg perioda. Verovatno su ovi rezultati posledica povremene epidemije NoV u populaciji ljudi u letnjem periodu, a neposredno pred sprovedeno uzorkovanje. Norovirusi se uglavnom češće detektuju u zimskom periodu (Alen i sar, 2013), ali je detekcija veoma česta i u letnjem periodu u uzorcima površinske vode koje se koriste u rekreativne svrhe (Lodder i de Roda Husman, 2005). Pozitivni uzorci na NoV u Brazilu su detektovani u periodu obilnih padavina, od decembra do juna meseca (Parasidis i sar, 2013b). U ovoj disertaciji, u 21 uzorku prikupljenom sa plaža NoV GII je detektovan u 6 (28,6%) uzoraka. U istim uzorcima prisustvo NoV GI je potvrđeno u 4 (19,1%) uzoraka. Takođe, prisustvo virusa je potvrđeno tokom cele godine i s obzirom da je za infekciju dovoljan veoma mali broj viriona, ovi rezultati ukazuju da postoji rizik po zdravlje ljudi na ovim lokalitetima, naročito u letnjem periodu kada se te površinske vode koriste u rekreativne svrhe. Samo kao primer veličine mogućeg rizika, u Novom Sadu plažu Štrand tokom leta za 1 dan poseti oko 20.000 ljudi.

Od 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, NoV Gi i GII nisu detektovani, kao ni u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička i u SRP Obedska bara. Ovakvi rezultati su očekivani, jer na pomenutim lokalitetima nije bilo registrovanih izlivanja otpadnih voda u vreme uzorkovanja, a lokaliteti su pod znatno manjim antropogenim uticajem u odnosu na druge lokalitete.



6.2.2 Prevalenca NoV u kanalizacionim vodama

Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode NoV GII je detektovan u 66,7% uzoraka kanalizacione vode, dok je prevalenca NoV GI, u istim uzorcima bila 22,2%. Influenti gradske kanalizacije u Somboru, Subotici i gradska kanalizaciona voda u Odžacima su bili pozitivni na NoV GII u 2 od 3 uzorkovanja. Efluent u Somboru je bio pozitivan u dve sezone uzorkovanja. U Subotici su uzorci nakon tretmana prečišćavanja bili pozitivni u sve tri sezone uzorkovanja, dok je u Odžacima, recipijent DTD kanal nakon ulivanja kanalizacione vode bio negativan na NoV GII u sve tri sezone uzorkovanja. Influenti gradske kanalizacije u Somboru i Subotici su bili negativni na NoV GI u sve tri sezone uzorkovanja. Uzorci gradske kanalizacione vode u Odžacima su bili pozitivni u 2 od 3 uzorkovanja. Efluent u Somboru je bio negativan u sva tri slučaja uzorkovanja, kao i recipijent u Odžacima, dok je uzorak nakon tretmana prečišćavanja u Subotici bio pozitivan na NoV GI samo u jednom od 3 uzorka. U ovom slučaju takođe, kao i kod HAdV, NoV je detektovan nakon tretmana prečišćavanja, tako da je najverovatnije virus bio prisutan u uzorku kanalizacije, ali ne homogeno. Ovakvi rezultati su očekivani i u skladu su sa sličnim istraživanjima u svetu koja su potvrdila prisustvo NoV u kanalizacionim vodama pre i nakon prečišćavanja (van den Berg i sar, 2005; Maunula i sar, 2009; La Rosa i sar, 2010; Blanco Fernández i sar, 2011; Campos i sar, 2013; Fumian i sar, 2013; Hassine-Zaafrane i sar, 2014; Victoria i sar, 2014; Kaas i sar, 2015). Rezultati istraživanja u Japanu su pokazali da su NoV GI i GII detektovani tokom cele godine, ali i da postoji konstantno smanjenje detektabilnosti virusa u vodi nakon tretmana prečišćavanja (Katayama i sar, 2008).

Rezultati u ovoj disertaciji su pokazali da je NoV GII detektovan u svim sezonama uzorkovanja sa prevalencom od 33,3% do 100,0%, dok je NoV GI je detektovan u sezonama jesen/zima 2013. i proleće 2014. godine sa prevalencom od 33,3% u oba uzorkovanja, čime je i utvrđeno je da je genotip II češće detektovan u odnosu na NoV GI u uzorcima kanalizacionih voda. Rezultati detekcije NoV GI i GII dobijeni u ovoj disertaciji indirektno su potvrdili da je norovirus cirkulisao u populaciji ljudi u periodu od oktobra 2012. do juna 2014. godine na području sa kog je vršeno uzorkovanje. Ovi rezultati su u korelaciji sa dostupnim podacima Instituta za javno zdravlje Vojvodine u kojima se navode registrovane epidemije norovirusa na području Vojvodine i broj potvrđenih slučajeva detekcije norovirusa kod pacijenata (Ilic i Marković, 2013; Ilic, 2014; Ilic, 2015; Relic i sar, 2015).



Neadekvatna dezinfekcija i prečišćavanje otpadnih voda su najčešći razlog za epidemije do koje često dolazi usled kontaminacije podzemnih voda. Pored toga što su rezultati u ovoj disertaciji ukazali na važnost redovnog monitoringa kanalizacionih voda pre i nakon prečišćavanja, jedan od primera je u Finskoj, gde postoji više od 1.300 postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Mnogi od ovih prečišćavača koriste površinske vode (jezera i reke) kao recipijente. U periodu od 5 godina prijavljena je 41 epidemija izazvana vodom za piće. Na prisustvo virusa je ispitano 28 (61,0%) epidemija. U tom istraživanju NoV GI je detektovan u 86,9% uzoraka a NoV GII u 13,1% (Maunula i sar, 2005).

Rezultati istraživanja u ovoj disertaciji ukazuju na potrebu redovnog monitoringa neprečišćenih i prečišćenih otpadnih voda pre njenog ispuštanja u površinske vode, kao i za procenu efikasnosti tretmana za prečišćavanje otpadnih voda. Takođe, rezultatima je potvrđeno da postoji potreba za ulaganjem u postrojenja za tretman otpadnih voda kako bi se smanjila cirkulacija virusa u populaciji ljudi, naročito ako se kanalizaciona voda uliva direktno u površinske vode koje se koriste u rekreativne svrhe i kao izvor vode za piće.

6.2.3 Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih NoV

Norovirus (NoV) pripada porodici *Caliciviridae* i podeljen je na pet genogrupa (GI, GII, GIII, GIV i GV). Humani norovirusi pripadaju GI, GII i GIV genogrupama, dok GIII i GV genogrupama pripadaju norovirusi goveda i murine norovirus (MnoV) (Stals i sar, 2012).

Sekvencirani deo genoma NoV GI utvrđen u istraživanjima ove doktorske disertacije potiče iz uzorka gradske kanalizacije u gradu Odžaci, a NoV GII potiče iz uzorka reke Save u Sremskoj Mitrovici, nizvodno od izliva kanalizacije. Pripadnost sekvenci iz Srbije genogrupama I i II je potvrđena poređenjem sekvenci sa referentnim izolatima za GI i GII. Takođe, sekvence NoV GI i GII su upoređene sa još 18 sekvenci NoV iz GenBank i dobijen je visok procenat sličnosti sa odgovarajućim genotipovima (97,0-99,0%). Na osnovu genetičke sličnosti, može se pretpostaviti da virusi detektovani u ovom radu imaju značajan epidemijski potencijal.

Dominantan genotip, najčešći uzrok epidemija i sporadičnih slučajeva je genotip 4 genogrupe II NoV. Norovirusi su genetski veoma raznovrsni i često dolazi do rekombinacija između genotipova. Sekvenca detektovanog NoV GII iz Srbije je bila veoma slična sojevima norovirusa koji su poreklom iz uzoraka stolice dece izolovanih u Južnoafričkoj Republici



(Mans i sar, 2016). Takođe, sekvenca je pokazala 99% sličnosti sa izolatima iz Etiopije izolovanih iz uzoraka stolice ljudi (Sisay i sar, 2014), izolatima iz Italije tokom epidemije u Breši (Pavoni i sar, 2014), sojevima iz Japana (Sato i sar, 2016) i Bangladeša (Das i sar, 2015). Velika sličnost NoV iz ovog istraživanja sa izolatima iz drugih udaljenih zemalja ukazuje na to da su norovirusi veoma rasprostranjeni. Razlog može biti u visokoj kontagioznosti norovirusne infekcije. Norovirus se brzo prenosi u humanoj populaciji, a sa vremena na vreme se pojave mutacije koje dovode do pojave novih genetskih varijanti koje tada ponovo za kratko vreme prenose u populaciju ljudi.

6.3 Prisustvo i raširenost PAdV u površinskim i kanalizacionim vodama

6.3.1 Prevalenca PAdV u površinskim vodama

Adenovirusi svinja se mogu uspešno koristiti kao jedan od marker virusa za praćenje fekalne kontaminacije životne sredine poreklom od životinja (Hundesda i sar, 2009). U ovom istraživanju PAdV je detektovan u 11.1% (11/99) uzoraka na 30,0% (9/30) lokaliteta. Na 4 lokaliteta reke Dunav u kojima je utvrđeno prisustvo ovog virusa postoji izliv gradske kanalizacije i pretpostavlja se da je u tom slučaju u gradskoj kanalizaciji prisutna i otpadna voda iz klanica životinja. Ovi rezultati su ukazali na neophodnost praćenja prisustva ovog virusa, jer je pronađen na lokalitetu gradske plaže. Nalaz PAdV na ovom lokalitetu je ukazao da je najverovatnije došlo do ulivanja otpadnih voda iz klanica u gradsku kanalizacionu mrežu, ili je došlo do ispuštanja otpadnih voda sa farmi u Dunav, uzvodno od grada Novog Sada. Isti slučaj je i sa otpadnim vodama na lokalitetima DTD kanala u Odžacima, Kikindi, rekama Krivaja i Begej. Većina klanica u Vojvodini ne poseduje sisteme za prečišćavanje otpadnih klaničnih voda i sve otpadne vode dospevaju u kanalizacione sisteme ili se izlivaju direktno u recipijent. Ovo važi i za otpadnu vodu sa farmi životinja u Srbiji. Na lokalitetu reke Sava na gradskoj plaži, takođe je detektovan PAdV i pretpostavlja se da je postojala fekalna kontaminacija iz sela koja se nalaze uzvodno od Sremske Mitrovice i u kojima je nešto intezivnije uzgajanje svinja u odnosu na druga mesta u Vojvodini. Adenovirus svinja nije detektovan na 21/30 (70,0%) lokaliteta površinskih voda. Ovi rezultati predstavljaju prvu detekciju PAdV u Srbiji, jer ne postoje dostupni literaturni podaci o ispitivanju prisustva



ovog virusa u površinskim vodama u Srbiji. Takođe, ovi rezultati ukazuju na neophodnost monitoringa površinskih voda kao i sistema za prečišćavanje otpadnih voda iz klaničnih industrija i sa farmi životinja. Istovremeno, dobijeni rezultati ispitivanja govore u prilog literaturnim navodima da se PAdV može uspešno koristiti za praćenje fekalne kontaminacije životne sredine poreklom od svinja.

Rezultati su pokazali da se korišćene metode koncentrovanja PAdV u uzorcima vode i molekularne metode detekcije ovog virusa, mogu uspešno koristiti za utvrđivanje prisustva ovog virusa u površinskim vodama. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima mnogih studija sprovedenih od strane drugih autora. Prisustvo PAdV u površinskim vodama je potvrđeno u Mađarskoj, Grčkoj, Poljskoj, Španiji, Brazilu (Hundesda i sar, 2009; Kokkinos i sar, 2012; Kern, 2014; Dalla Vecchia i sar, 2015). Interesantno je spomenuti da su rezultati detekcije PAdV nested PCR testom u ovoj disertaciji potvrdili uspešnost qPCR testa jer su i ovim metodama detektovani, a samim tim i potvrđeni neki od pozitivnih uzoraka, od kojih je potom jedan uzorak sekvenciran i tipiziran. Pozitivni uzorci na prisustvo PAdV su imali veoma visoke Ct vrednosti, ukazujući time na veoma mali broj virusnih čestica u uzorcima, pa s obzirom da su konvencionalne PCR metode inače manje osetljive od korišćenih qPCR metoda, može se pretpostaviti da je to bio razlog što nisu potvrđeni svi pozitivni nalazi iz qPCR testa. U rezultatima vizuelizacije na gelu u obe reakcije (PCR i nested PCR) se moglo uočiti više nespecifičnih produkata, koji ukazuju na potrebu dalje optimizacije reakcija i koje bi trebalo da budu tema u budućim sličnim istraživanjima.

U ovom istraživanju PAdV je detektovan u svim sezonama uzorkovanja. Tokom zime 2012. godine PAdV je detektovan u 22.2% uzoraka. U sezoni leto 2013. godine PAdV je detektovan u 13.3% uzoraka površinske vode. U periodu uzorkovanja jesen/zima 2013. godine PAdV je detektovan u 3.3%, a na proleće 2014. godine u 13.3% uzoraka površinskih voda. Rezultati ukazuju na neophodnost praćenja kontaminacije površinskih voda jer su PAdV prisutni u površinskim vodama u svim sezonama tokom godine. Slična istraživanja su objavili Hundesda i sar. (2006) gde je PAdV imao visoku stopu detekcije tokom cele godine, u uzorcima rečne vode, nizvodno od izliva otpadnih voda sa farmi. Ovo je potvrdilo hipotezu o veoma čestom izlučivanju virusa u životnu sredinu i otpornost na prirodne procese inaktivacije. Rusinol i sar. (2014) su takođe pokazali da je u reci Glafkos metodom real-time PCR utvrđeno prisustvo PAdV tokom cele godine. Fekalna kontaminacija površinskih voda poreklom od svinja je detektovana tokom zime (1/24 uzorka), leta (5/48 uzorka) i tokom



jeseni (1/42 uzorka). U uzorcima iz reke Tise prevalenca tokom zime se kretala između 55 i 90%, a tokom proleća, leta i jeseni je iznosila 100% (Rusinol i sar, 2014). Jedan od mogućih razloga zašto je utvrđena niska prevalenca PAdV u analiziranim površinskim vodama, u ovom istraživanju, je zato što je intenzitet uzgajanja domaćih životinja u Srbiji je veoma oslabio u poslednjih nekoliko godina, usled ekonomske krize. Mnogo velikih farmi svinja je sada zatvoreno ili su ograničene na uzgoj malog broja životinja. Zbog ovakve situacije, postoji veoma mala proizvodnja stajskog đubriva i otpadnih voda sa farmi i samim tim je nešto niži nivo kontaminacije životne sredine ovim virusima.

Od 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, kao i u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, i SRP Obedska bara nije detektovan PAdV. Ovi rezultati su očekivani jer u blizini lokaliteta nije potvrđeno prisustvo farmi i izlivanja otpadnih voda u površinske vode. Može se pretpostaviti da PAdV u populaciji divljih svinja ili ne cirkulišu ili je prevalenca PAdV verovatno niska.

6.3.2 Prevalenca PAdV u kanalizacionim vodama

Stajnjak se veoma često koristi kao đubrivo za poljoprivredno zemljište. Enterični virusi su veoma stabilni u fekalijama i urinu. Nakon disperzije virusa u životnu sredinu, stopa inaktivacije varira u zavisnosti od vrste virusa. Svakako, inaktivacija je brža u tečnom nego u čvrstom stajnjaku. Enterični virusi prisutni u stajnjaku mogu dugo preživljavati na temperaturi od -5°C, naročito u odsustvu UV zračenja (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012).

Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije niti u jednom nije detektovan PAdV. Takođe, PAdV nije detektovan u Subotici i Somboru nakon tretmana prečišćavanja, ali je detektovan u Odžacima u DTD kanalu. Može se pretpostaviti da je u Odžacima došlo do difuzne kontaminacije DTD kanala iz drugih izvora a ne iz gradske kanalizacije. Svakako da je u Odžacima proizvodnja svinja veća u odnosu na veće gradove Suboticu i Sombor, pa su ovakvi rezultati očekivani. I drugi autori su potvrdili da se prisustvo PAdV ne očekuje u urbanim sredinama gde nema poljoprivrednih aktivnosti, a pojavljuje se u uzorcima otpadnih voda iz klanica i u rečnim vodama koje se nalaze u blizini farmi (Hundesca i sar, 2006; Hundesca i sar, 2010; Bofill-Mas i sar, 2013; Rusinol i sar, 2014).

Adenovirus svinja je prvi put izolovan 1964. godine iz različitih organa svinje sa simptomima dijareje. Nakon toga PAdV je identifikovan i kod svinja koje nisu ispoljavale simptome



(Sanford i Hoover, 1983), kao i kod svinja sa simptomima oboljenja centralnog nervnog sistema, respiratornog trakta, pobačaja i slično (Nietfeld i Leslie-Steen, 1993). Od kada je prvi put izolovan PAdV kod svinja, nisu postojali podaci o patogenosti ovog virusa sve dok Shaddock i saradnici (1967) nisu objavili izolaciju ovog virusa iz mozga svinja i ukazali na patogenost PAdV. Do sada nisu publikovani podaci o ispitivanju PAdV kod svinja u Srbiji, ali su ova istraživanja rađena u drugim evropskim zemljama (Maluquer de Motes i sar, 2004; Hundesa i sar, 2006).

6.3.3 Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih PAdV

Postoji pet serotipova PAdV: serotip 1-3 (PAdV 1-3) koji pripada PAdV tipu A, serotip 4 (PAdV-4) pripada PAdV tipu B i serotipa 5 (PAdV-5) pripada adenovirusu svinja tip C (Hammond i Johnson 2005). Sekvencirani deo genoma PAdV 5 iz ovog rada potiče iz reke Dunav, sa plaže Oficirac. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom sekvence PAdV iz ove disertacije potvrđeno je da pripada tipu 5. Sekvenca je bila potpuno identična sa izolatom PAdV 5 koji je detektovan u rečnoj vodi u Španiji (Hundesa i sar, 2006), i filogenetski najbližija sa izolatima objavljenim od strane istih autora, a koje potiču iz reka i otpadnih voda iz domaćinstva u Španiji, kao i sa kompletnim genomom adenovirusa svinja tip 5 iz Mađarske. Nagy i sar. (2001) su potvrdili filogenetskom analizom da je PAdV-5 bliže povezan sa određenim goveđim adenovirusima nego sa drugim adenovirusima svinja. Kako bi se dodatno potvrdila pripadnost genotipu 5, sekvenca detektovanog PAdV je upoređena i sa izolatima drugih tipova. Rezultati istraživanja Pauly i sar. (2015) su pokazali da preklapanje staništa ljudi, stoke i divljih životinja može da utiču na prenošenje patogena i olakša unakrsno prenošenje patogena, koji su ekološki veoma stabilni, naročito adenovirusi. Takođe, ovo istraživanje je ukazalo na važnost istraživanja obrnutog zoonotskog prenošenja virusa.

U ovoj disertaciji je prvi put potvrđeno prisustvo PAdV u površinskim vodama u Srbiji, a drugi put u Evropi potvrđen slučaj detektovane sekvence genoma PAdV tip 5 u površinskoj vodi.



6.4 Prisustvo i raširenost BPyV u površinskim i kanalizacionim vodama

6.4.1 Prevalenca BPyV u površinskim vodama

Za praćenje izvora fekalne kontaminacije poreklom od životinja, prvenstveno od goveda, u životnoj sredini BPyV se takođe može koristiti kao marker virus (Hundesda i sar, 2006; Bofill-Mas i sar, 2013). U ovom istraživanju BPyV je detektovan u 7.1% uzoraka površinskih voda. Tokom zime 2012. godine BPyV nije detektovan niti u jednom od uzoraka reke Dunav na tri lokacije u Novom Sadu. U sezoni leto 2013. godine BPyV je detektovan u uzorku reke Krivaje i uzorku reke Save sa plaže u Sremskoj Mitrovici. U periodu uzorkovanja jesen/zima 2013. godine utvrđeno je prisustvo BPyV u oba uzorka reke Dunav sa plaže Štrand. Na proleće 2014. godine BPyV je detektovan u 3 uzorka reke Dunav u Novom Sadu (plaža Oficirac, reka Dunav nizvodno od izliva kanalizacije GC-1 i GC-2). Ovi rezultati ukazuju na neophodnost monitoringa površinskih voda na prisustvo ovog virusa. Poliomavirus goveda je detektovan u svim sezonama tokom godinu dana ispitivanja. Takođe, u uzorcima voda sa plaža do kontaminacije ovim virusima je najverovatnije došlo usled izlivanja fekalija poreklom od životinja, uzvodno od mesta uzorkovanja. Uzvodno od plaže reke Save nalaze se sela u kojima je intenzivan uzgoj goveda. Takođe, u Novom Sadu uzvodno od plaže Štrand su sela u kojima su uzgoj goveda u malim farmama i ispaša intezivirane uz obalu Dunava. Prisustvo ovog virusa u uzorcima reke Dunav u Novom Sadu nizvodno od izliva gradske kanalizacije ukazuje da je do fekalne kontaminacije poreklom od goveda najverovatnije došlo i izlivanjem otpadnih voda sa farmi u sisteme gradske kanalizacije. Slična istraživanja su objavili Hundesa i sar. (2006) gde je BPyV imao visoku stopu detekcije tokom cele godine, u uzorcima rečne vode, nizvodno od izliva otpadnih voda sa farmi, što je potvrdilo hipotezu o veoma čestom izlučivanju virusa u životnu sredinu i otpornost na prirodne procese inaktivacije. Poliomavirus goveda u ovom radu nije detektovan na 23/30 lokaliteta površinskih voda i 2/3 lokaliteta gradske kanalizacije.

Primenjene metode koncentrovanja BPyV i molekularne metode detekcije ovog virusa, mogu uspešno koristiti za utvrđivanje prisustva ovog virusa u površinskim vodama. Takođe, ovi rezultati su u skladu sa rezultatima mnogih drugih studija sprovedenih širom sveta. Interesantno je primetiti da su rezultati detekcije BPyV nested PCR testom u ovoj disertaciji potvrdili uspešnost qPCR testa jer su i ovim metodama detektovani, a samim tim i



potvrđeni neki od pozitivnih uzoraka, od kojih je potom jedan uzorak sekvenciran i tipiziran. Kao i kod PAdV, pozitivni uzorci na prisustvo BPyV su imali veoma visoke Ct vrednosti, pa su najverovatnije mali broj virusnih čestica u uzorcima i manja osetljivost PCR metode razlozi što nisu potvrđeni svi pozitivni nalazi iz qPCR testa. U rezultatima vizuelizacije na gelu u obe reakcije (PCR i nested PCR) se moglo uočiti više nespecifičnih produkata, koji ukazuju na potrebu dalje optimizacije reakcija i koje bi trebalo da budu tema u budućim sličnim istraživanjima.

Za sada ne postoje dostupni podaci o prisustvu BPyV u Srbiji, bilo u površinskim vodama, kanalizaciji, otpadnim vodama, pa ni kod goveda. Do sada postoje samo podaci da je u Grčkoj, Poljskoj i Srbiji tokom 2009. i 2010. godine metodom real-time PCR testirano prisustvo BPyV u vodi koja se koristi za navodnjavanje zelene salate. U 5,1% uzoraka je detektovan virus. Takođe u ovom slučaju je ispitana i salata koja se navodnjavala ovom vodom i đubrivo za zemljište na kom se uzgaja salata. Poliomavirus goveda nije detektovan u ovim uzorcima (Kokkinos i sar, 2012). U sličnom istraživanju, istom metodom, u vodi za navodnjavanje malina utvrđeno je prisustvo BPyV u 1/89 (1,1%) uzoraka. Ovo istraživanje je demonstriralo potencijal virusa da uđe u lanac ishrane putem kontaminirane hrane, u ovom slučaju bobičastog voća i vode koja se koristi u procesu proizvodnje voća (Maunula i sar, 2013). Rezultati prisustva ovog virusa u površinskim vodama u svetu objavljeni su u nekoliko studija. Poliomavirus goveda je detektovan u površinskim vodama u Španiji i Mađarskoj metodom real-time PCR. U Španiji je BPyV detektovan u 95% (20/21) uzoraka, a u Mađarskoj u 78,29% (101/129) što je dokazalo da je BPyV koristan indikator za praćenje fekalne kontaminacije (Hundesda i sar, 2006; Hundesda i sar, 2010; Kern, 2014). Naši rezultati ukazuju da su površinske vode u Srbiji kontaminirane u manjem stepenu ovim virusom u odnosu na ove studije.

U veoma obimnom istraživanju Rusinol i sar. (2014), ispitano je real-time PCR metodom ukupno ukupno 792 uzorka sa pet različitih lokaliteta: Llobregat reka u Španiji, Glafkos reka u Grčkoj, Umealven reka u Švedskoj, Tisa u Mađarskoj i reka Negro u Brazilu. Voda iz svih ovih reka je uzorkovana u blizini gradova gde su reke pod uticajem otpadnih voda i BPyV je detektovan tokom cele godine i obe sezone uzorkovanja. U ovoj disertaciji prisustvo BPyV u površinskim i otpadnim vodama Vojvodine je takođe utvrđeno tokom cele godine.

Od 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, kao i u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, i SRP Obedska bara nije detektovan BPyV. Ovi rezultati su očekivani jer u



blizini lokaliteta ne postoji farma goveda, niti se otpadne vode izlivaju u ove površinske vode.

6.4.2 Prevalenca BPyV u kanalizacionim vodama

Od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije BPyV je detektovan u jednom uzorku gradske kanalizacije u Somboru. Ostali uzorci gradske kanalizacije, kao i efluenti nakon prečištača u Subotici i Somboru, su bili negativni na prisustvo ovog virusa. U uzorcima gradske kanalizacije se svakako ne očekuje prisustvo BPyV, s obzirom da je virus specifičan za goveda kao domaćine. Detekcija virusa u jednom uzorku, je najverovatnije posledica ulivanja otpadnih voda iz klanice u kanalizacionu mrežu u Somboru. U literaturi se mogu pronaći različiti podaci vezani za prisustvo ovog virusa u kanalizacionim i otpadnim vodama. U Španiji je testirano 9 uzoraka gradske kanalizacije na prisustvo BPyV. Poliomavirus goveda nije utvrđen niti u jednom od ispitanih uzoraka (Hundesca i sar, 2006), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu. U nekim istraživanjima u svetu prisustvo BPyV je utvrđeno u uzorcima kanalizacije koje su bile opterećene otpadnim vodama sa farmi. Tako u Mađarskoj, u blizini grada Szolnok, BPyV je detektovan u uzorcima vode iz reke Tise nizvodno od 20 farmi goveda koje se nlaže u blizini reke. Sve farme i klanice svoje otpadne vode tretiraju u gradskom prečištaču otpadnih voda. Za ovu reku su karakteristične sezonske poplave što može predstavljati rizik kako za stanovništvo tako i za životinje (Rusinol i sar, 2014).

Kao što je slučaj sa farmama svinja, tako je i veliki broj farmi goveda u Vojvodini zatvoren i proizvodnja se svodi samo na nekoliko velikih farmi. Dominira gajenje manjeg broja goveda u pojedinačnim domaćinstvima, pa se može smatrati da je kontaminacija životne sredine otpadom sa farmi goveda trenutno mala. Do sada nisu pronađeni dostupni podaci za ispitivanje BPyV u fecesu ili serumu goveda u Srbiji, ali su u svetu su rađena takva ispitivanja. U Mičigenu je od 18 uzoraka fecesa krava utvrđeno prisustvo BPyV u 5,6% (Wong i Xagorarakis, 2011). Parry i Gardner (1986) su ispitivali prisustvo BPyV kod goveda i ljudi. Kod 62,0% goveda je utvrđena seropozitivnost. Takođe, seropozitivno je bilo 71,0% veterinarskih hirurga, 50,0% odgajivača goveda, 40,0% radnika u klanicama, 16,0% tehničkog osoblja u Veterinarskom zavodu i 10,0% studenata veterinarske medicine. Poliomavirus goveda je čest kontaminant goveđeg seruma na Novom Zelandu. Učestalost



BPyV kod odraslih goveda u serumu je znatno niža nego u fetalnom i telećem serumu. Prisustvo BPyV je utvrđeno u 46 (70,0%) serija fetalnog goveđeg seruma, 11 (32,0%) serija seruma teladi i dve (5,0%) serije ABS/plazme, sa ukupnom prevalencom od 42,0%. Nijedan od 112 seruma odraslih goveda nije dao pozitivnu reakciju (Wang i sar, 2005). Upotreba fetalnog telećeg ili goveđeg seruma je veoma rasprostranjena u biološkim, medicinskim i veterinarskim laboratorijama. Komercijalne serije goveđeg seruma obično podrazumevaju zbirne uzorke seruma prikupljene od više od 100 životinja. Ukoliko je BPyV prisutan u serumu, postoji ozbiljan rizik od kontaminacije kultura ćelija koje se koriste za istraživanje, u dijagnostičke ili proizvodne svrhe. Uzorci 16 serija fetalnog telećeg seruma, tri serije seruma tek rođenog teleta, jedna serija seruma odraslih goveda i jedna serija fetalnog konjskog seruma od 9 različitih komercijalnih dobavljača su ispitani na prisustvo BPyV. U 14 od 20 serija, kod 8/9 dobavljača, je detektovan BPyV (Schuurman i sar, 1991). Rezultati u ovoj disertaciji su indirektno potvrdili da BPyV cirkuliše u populaciji goveda i da je veoma bitno redovno praćenje i izveštavanje o stanju kontaminacije voda. S obzirom da je BPyV u ovom radu detektovan u površinskim vodama koje se koriste u rekreativne svrhe, takođe je ukazano da je redovan nadzor kontaminacije površinskih voda veoma bitan zbog praćenja markera fekalne kontaminacije kako humanog, tako i animalnog porekla.

6.4.3 Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih BPyV

Poliomavirusi su DNK virusi koji mogu inficirati različite vrste kičmenjaka, uključujući glodare, ptice, zečeve, goveda i ljude. Familija *Polyomaviridae* obuhvata jedan rod *Polyomavirus* sa 13 vrsta (Hundesda i sar, 2006).

Sekvencirani deo genoma BPyV iz ovog rada potiče iz reke Dunav, sa plaže Štrand u Novom Sadu. Ovo je prvi slučaj potvrde prisustva BPyV u površinskim vodama u Srbiji. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom je potvrđeno da izolat iz ovog rada pripada tipu 1. Sekvenca je pokazala 95-98% sličnosti sa referentnim izolatom BPyV, kao i sa drugim prijavljenim izolatima u Evropi koji potiču iz otpadnih voda iz klanica i rečnih voda. Referentni izolat korišćen u filogenetskom stablu je genom BPyV tip 1 izolovan prvi put iz kulture ćelija bubrega majmuna (Schuurman i sar, 1990, 1992). Sekvenca detektovanog virusa iz Srbije je pokazala 98% sličnosti sa 6 izolata iz Španije, koji potiču iz uzoraka otpadnih voda iz klanica i reka, autora Hundesda i sar. (2006). Takođe, BPyV iz ove



disertacije je pokazao 98% sličnosti sa BPyV izolatom BEL1 - BPyV tip 1 koji je izolovan iz slezine goveda u Belgiji 2014. godine (Van Borm i sar, 2016). Takođe, sekvenca dela genoma BPyV u 97% je slična sa izolatom BPyV soj 1S5 iz SAD, koji je izolovan iz mlevenog mesa (Peretti i sar, 2015), kao i sa BPyV tipom 1 izolovanim iz limfnih čvorova krave sa farme u Kataloniji (Ben Salem i sar, 2016). Pripadnost izolata BPyV genotipu 1 je dodatno potvrđena rezultatima filogenetske analize.

6.5 Prisustvo i raširenost HEV u površinskim i kanalizacionim vodama

6.5.1 Prevalenca HEV u površinskim vodama

Hepatitis E virusi se prenose fekalno-oralnim putem, najčešće putem zagađene vode i sa jedne osobe na drugu (Cook i Rzesutka, 2006.). Ovaj virus je češće detektovan u zemljama u razvoju, gde je slabo razvijena kanalizaciona mreža ili uopšte ne postoji. Autohtoni sojevi HEV su prijavljeni i u nekim visoko razvijenim zemljama u gradskoj kanalizaciji (Pina i sar, 2000).

Rezultati u ovoj disertaciji predstavljaju prve nalaze HEV u površinskim i kanalizacionim vodama u Srbiji. Hepatitis E virus je detektovan u 3,0% uzoraka površinskih voda. Lokaliteti na kojima je utvrđeno prisustvo ovog virusa nalaze se nizvodno od izliva kanalizacije. U pitanju su lokaliteti: plaža Oficirac u Novom Sadu, reka Sava u Sremskoj Mitrovici i KCIII kanal u Vrbasu. S obzirom da se zajedno sa gradskom kanalizacijom u površinske vode izlivaju i otpadne vode iz klanica, i kako je HEV veoma rasprostranjen u populaciji svinja u Srbiji (Lupulovic i sar, 2010; Petrovic i sar, 2014b), izvor prisustva HEV u površinskim vodama može biti ljudskog i/ili životinjskog porekla. U ovoj disertaciji HEV je detektovan u niskom procentu. Tokom zime 2012. godine HEV je detektovan u jednom od uzoraka reke Dunav na tri lokacije u Novom Sadu (11,1%). U sezoni leto 2013. godine HEV je detektovan u 6,7% testiranih površinskih voda. U periodu uzorkovanja jesen/zima 2013. godine HEV nije detektovan niti u jednom od uzoraka površinske vode. Takođe, u toku poleća 2014. godine HEV nije detektovan. Bez obzira na nizak procenat detekcije virusa u ovoj disertaciji, rezultati su ukazali da virus ipak cirkuliše u životnoj sredini i da postoji rizik za zdravlje ljudi i životinja. Takođe, rezultati su pokazali da se metode koncentrovanja HEV u uzorcima vode i



molekularne metode detekcije ovog virusa, mogu uspešno koristiti za utvrđivanje njegovog prisustva u površinskim vodama. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima mnogih drugih studija sprovedenih širom sveta. U Sloveniji, od 60 testiranih uzoraka površinskih voda metodom nested RT-PCR, u dva uzorka je detektovan HEV. Jedan od pozitivnih uzoraka potiče iz reke koja se nalazi nizvodno od postrojenja za prečišćavanje otpadnih kanalizacionih voda sa farme (Steyer i sar, 2011). Interesantno je primetiti da je u ispitivanim uzorcima voda RT-qPCR testom HEV detektovan u malom procentu, ali su rezultati detekcije HEV nested PCR testom u ovoj disertaciji potvrdili uspešnost qPCR testa jer su i ovim metodama detektovani, a samim tim i potvrđeni neki od pozitivnih uzoraka, od kojih je potom po jedan uzorak u ORF1 i ORF2 delu genoma sekvenciran i tipiziran. U rezultatima vizuelizacije na gelu se moglo uočiti više nespecifičnih produkata, koji ukazuju na potrebu dalje optimizacije reakcija i koje bi trebalo da budu tema u budućim sličnim istraživanjima.

Hepatitis E virus je detektovan u površinskim vodama i u drugim studijama (Kitajima i sar, 2009; Rutjes i sar, 2009; Li i sar, 2014). Ono što je zajedničko za sve studije, uključujući i rezultate dobijene u ovom radu je nemogućnost utvrđivanja izvora kontaminacije površinskih voda, s obzirom da HEV inficira i ljude i životinje.

Hepatitis E virus je detektovan u površinskim vodama koje se koriste u rekreativne svrhe. U ovom radu je HEV detektovan u uzorku vode sa plaže Oficirac u Novom Sadu. S obzirom da je hepatitis E zoonotski virus, ovaj nalaz ukazuje na neophodnost redovnog praćenja i izvestavanja o stanju kontaminacije površinskih voda koje se koriste u rekreativne svrhe. Takođe, nalaz i ovog virusa ukazuje na neophodnost izgradnje postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, naročito u velikim gradovima kao što je i Novi Sad, u kojem se sva gradska kanalizacija izliva u Dunav. Nalaz ovog virusa je od velikog značaja, s obzirom da je u nekoliko studija potvrđeno da površinske vode mogu biti izvor infekcije. Tako je potvrđeno nekoliko slučajeva infekcije HEV-om nakon kupanja u reci Gang u Indiji nakon konzumiranja površinske vode (Pond, 2005). U prilog činjenici da je izgradnja postrojenja za prečišćavanje vode od velikog značaja idu i rezultati dobijeni u Italiji: 16.7% uzoraka gradske kanalizacije je bilo pozitivno na HEV pre tretmana, a nakon prečišćavanja HEV nije detektovan ni u jednom uzorku (Idolo i sar, 2013). Infekcije HEV su u vezi sa lošim sanitarnim uslovima, kako u nerazvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju. U gradu Faisalabad u Pakistanu kanalizacija iz domaćinstava teče kroz naselje u otvorenim kanalima za vodu. Cevi za



vodosnabdevanje su veoma blizu ovih kanala i uvek postoji mogućnost poprečne kontaminacije (Ahmad i sar, 2015). U Srbiji ima veoma malo postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, i one se najčešće neprečišćene izlivaju u reke i jezera, što predstavlja potencijalni rizik za zdravlje ljudi i životinja.

Epidemije hepatitisa E često pokazuju sezonski karakter. Na osnovu ograničenog broja pozitivnih uzoraka u ovom istraživanju nije moguće zaključiti da li to važi i za naše podneblje. Naime, u istraživanju koje je sprovedeno HEV je detektovan u jednom uzorku tokom zime i dva uzorka tokom leta. Epidemije hepatitisa E često pokazuju sezonski karakter. Ipak, rezultati drugih autora ukazuju na jasan sezonski karakter epidemija ovim virusom i detekcije HEV u površinskim i otpadnim vodama. U Nepal u hepatitis E virus se najčešće pojavljuje u toku leta (Kamar i sar, 2014). Analiziranjem 12 studija o sezonskoj varijabilnosti hepatitisa E virusa utvrđeno je da je u većini zemalja HEV bio prisutan tokom proleća i leta. U 2 od 12 istraživanja HEV je bio prisutan tokom zime (Fares, 2015). Takođe, sezonska varijacija hepatitisa E virusa je potvrđena je i u Severozapadnoj Engleskoj, gde je HEV bio prisutan najčešće tokom proleća i leta (Dalton i sar, 2008). Na osnovu navedenih studija jasno je da je neophodno uspostaviti monitoring HEV u toku sva četiri godišnja doba i u dužem vremenskom periodu, kako bi se utvrdilo u kojim godišnjim dobima se infekcije javljaju na području Vojvodine.

Od 6 uzoraka reke Dunav u lovištima Plavna i Karađorđevo, kao i u parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, i SRP Obedska bara nije detektovan hepatitis E virus. Ovi rezultati su očekivani, jer u blizini lokaliteta nije potvrđeno prisustvo farmi, niti izlivanja otpadnih voda sa farmi ili gradske kanalizacije u površinske vode. Rezultati takođe ukazuju da površinske vode u ovim lovištima ne predstavljaju izvor infekcije HEV-om za populacije divljih svinja.

6.5.2 Prevalenca HEV u kanalizacionim vodama

Tokom ovog istraživanja, od ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije niti u jednom nije detektovan HEV. Hepatitis E virus nije detektovan na 27/30 lokaliteta površinskih voda i 3/3 lokaliteta gradske kanalizacije. Iako je niska prevalenca ovog virusa, ona svakako ukazuje da HEV cirkuliše u populaciji ljudi i svinja. Niska prevalenca HEV u ovom istraživanju je slična sa rezultatima u nekim prethodnim istraživanjima u drugim zemljama (Kasorndorkbua i sar, 2005; Steyer i sar, 2011; Gentry-Shields i sar, 2015). Razblaživanje



koncentrovanog uzorka i odgovarajući protokol za ekstrakciju nukleinskih kiselina trebalo bi da smanje aktivnost potencijalnih inhibitora PCR. Moguće je i da je brojnost HEV bila mala, tj. da je stepen kontaminacije HEV bio ispod nivoa detekcije virusa, što su primetili i Kasorndorkbua i sar. (2005). Razlog niske detekcije HEV je najverovatnije posledica niske prevalencije HEV kod ljudi u Srbiji. Ranija istraživanja su utvrdila da je 15% dobrovoljnih davalaca krvi seropozitivno na HEV. Svi uzorci krvnih seruma su bili negativni na prisustvo RNK hepatitis E virusa (Petrovic i sar, 2014a). Ta prevalenca varira, ali je svakako mali broj ljudi koji izlučuju HEV da bi se on mogao detektovati u uzorcima kanalizacije (Petrovic i sar, 2014a). Rezultati u ovoj disertaciji su indirektno potvrdili da HEV cirkuliše u populaciji ljudi i u skladu sa pomenutim prethodnim istraživanjima, jer prevalenca kod ljudi nije toliko visoka da bi se u većem procentu nego što je u ovoj disertaciji, detektovala u površinskim vodama i kanalizaciji. Slični nalazi seroprevalencije HEV kod ljudi su zabeleženi i u zemljama u okruženju kao što su Mađarska, Rumunija i Crna Gora (Reuter i sar, 2009; Terzic i sar, 2009; Anita i sar, 2014). Kontinuirani monitoring prisustva virusa u životnoj sredini je veoma bitan. Kao i u Srbiji, u Grčkoj nije razvijen sistem ovakvog nadzora. U jednom istraživanju od novembra 2007. do jula 2009. godine metodom RT-PCR i nested PCR, ispitano je 48 uzoraka netretirane gradske kanalizacione vode. Niti u jednom od uzoraka nije detektovan HEV (Kokkinos i sar, 2011). Takođe, u Grčkoj u drugom istraživanju HEV nije detektovan niti u jednom od 5 uzoraka gradske kanalizacione vode metodom semi-nested PCR i nested PCR (Clemente-Casares i sar, 2003). Slične rezultate su dobili i Fauci i sar. (2010), koji su u samo 3 od 43 uzorka kanalizacione vode detektovali HEV. S druge strane, mnoga istraživanja širom sveta su pokazala da je HEV prisutan u velikom broju uzoraka iz gradske kanalizacije. Tako je u Španiji utvrđeno 29 pozitivnih uzoraka od ukupno 91 (Rodriguez Manzano i sar, 2010). Ekstreman primer predstavlja Indija, u kojoj se ovaj virus detektuje u 11-41% uzoraka, u gradu Vellore, gde se kanalizaciona voda meša sa podzemnim vodama, detektuje se čak u 55% uzoraka (Vivek i sar, 2003). Rezultati ukazuju da Vojvodina spada u grupu zemalja sa niskom stopom detekcije HEV u kanalizacionim vodama, odnosno sa niskom prevalencijom HEV kod ljudi. Redovan monitoring HEV u površinskim vodama je veoma bitan kako bi se ukazalo na potencijalni rizik za zdravlje ljudi i životinja. Svinje su glavni rezervoar hepatitis E virusa (Yugo i Meng, 2013). Sa porastom populacije svinja raste i količina stajskog đubriva i otpadnih voda (Viancelli, 2012). Zbog ekonomske krize, uzgoj svinja u Srbiji je znatno smanjen, pa se može pretpostaviti da je u ovom slučaju to jedan od



razloga niskog procenta detekcije hepatitis E virusa u površinskim vodama. Međutim, HEV je prisutan kod svinja u Srbiji. Prva preliminarna ispitivanja HEV kod svinja u Srbiji izvršena su 2008. godine (Petrovic i sar, 2008). Virusna RNK utvrđena je u 30,0% pregledanih zbirnih uzoraka fecesa i 45,0% zbirnih uzoraka tkiva svinja sa farmi i iz seoskih gazdinstva. Kod divljih svinja RNK HEV nije utvrđena (Petrovic i sar, 2008), ali je kod 34,8% ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv virusa hepatitis E (Lupulovic i sar, 2010, 2011). U Srbiji se veoma često žive svinje, kao i sveže svinjsko meso uvoze iz okolnih zemalja kao što su Hrvatska i Mađarska. Prisustvo HEV RNK je potvrđeno kod svinja u Sloveniji, Hrvatskoj, Mađarskoj i Rumuniji (Reuter i sar, 2009; Jemersic i sar, 2010; Steyer i sar, 2011; Anita i sar, 2014). Kontakt i izloženost zaraženim životinjama dovodi do povećanja rizika za prenošenje infekcije HEV-om na ljude.

6.5.3 Tipizacija i filogenetska analiza detektovanih HEV

Tretman otpadnih voda i vode za piće je veoma važan u sprečavanju infekcije HEV u zemljama u razvoju. Postoje četiri glavna genotipa HEV. Genotip 1 je zastupljen je prvenstveno u Azijskim zemljama, genotip 2 je izolovan u Meksiku, genotip 3 je identifikovan kod svinja i ljudi u SAD i mnogim drugim zemljama, a genotip 4 je identifikovan kod ljudi, svinja i drugih životinja u Aziji (Jothikumar i sar, 2006). Od 2000. godine genotip 4 HEV je postao dominantan uzrok bolesti i infekcija hepatitisa E virusa u Kini (Tian i sar, 2015). Genotip 3 hepatitis E virusa u Mađarskoj je endemskog karaktera. Smatra se da su domaće svinje glavni rezervoar ovog virusa (Reuter i sar, 2009). Prijavljeni su i HEV kod pacova, divljih svinja, slepih miševa, pastrmki i lasica (Kamar i sar, 2014).

Sekvencirani ORF1 deo genoma izolata HEV u ovom radu potiče iz uzorka reke Save u Sremskoj Mitrovici, nizvodno od izliva kanalizacije. Druga sekvenca HEV, koji je služio kao pozitivna kontrola detekcije virusa, potiče od uzorka žuči domaće svinje iz klanice u Novom Sadu. Pripadnost sekvenci HEV iz Srbije genotipu 3 virusa je potvrđena njihovim poređenjem sa referentnim izolatom HEV G3 izolovanog iz seruma pacijenta u bolnici u Tuluzu, Francuska (Legrand-Abeavanel i sar, 2009). Takođe, sekvence su upoređene sa izolatom genotip 3 iz Holandije “NL-Patient 129” (Hogema i sar, 2015). Sekvenca detektovanog HEV iz vode iz Srbije je pokazala sličnost sa izolatima HEV iz Srbije poreklom od domaćih svinja. To je bila prva detekcija i karakterizacija hepatitis E virusa u Srbiji kod



svinja (Petrovic i sar, 2010a). Takođe, sličnost je bila i sa izolatima poreklom od svinja iz Mađarske, Japana, Nemačke, Južne Koreje (Mizuo i sar, 2002; Forgach i sar, 2009; Song i sar, 2010; Nakano i sar, 2013), kao i sa izolatima poreklom od ljudi (Mitsui i sar, 2009; Takahashi i sar, 2009; Wenzel i sar, 2011).

Sekvencirani deo genoma ORF2 u ovom radu potiče od detektovanog HEV iz uzorka reke Dunav u Novom Sadu, nizvodno od izliva kanalizacije GC-1. Drugi sekvencija HEV, koji je služio kao pozitivna kontrola detekcije virusa, potiče od uzorka žuči domaće svinje iz klanice u Novom Sadu. Pripadnost sekvenci ORF2 dela genoma detektovanog HEV iz Srbije genotipu 3 virusa je potvrđena poređenjem sekvenci sa referentnim izolatom HEV G3 (Legrand-Abeavanel i sar, 2009) i pokazala je sličnost sa izolatima HEV poreklom od ljudi iz Holandije i Mađarske (sojevi HUN-E71 i HUN-E95), kao i sa izolatima poreklom od svinja iz Koreje (soj abKorea/Farm) i Austrije (soj sw7aAT) (Reuter i sar, 2009; Hosmillo i sar, 2010; Zwettler i sar, 2010; Riezebos-Brilman i sar, 2013).

Sekvenca HEV poreklom od domaće svinje koji je bio kontrola detekcije virusa je pokazao sličnost sa izolatima HEV iz Hrvatske i Italije, poreklom od domaćih svinja (Novosel i sar, 2009; Monini i sar, 2015), kao i izolatima poreklom od divlje svinje i humanog porekla iz Japana (Yamada i sar, 2009; Sato i sar, 2011).

Pripadnost genotipu 3 za obe sekvence ORF1 i ORF2 delova genoma HEV je dodatno potvrđena rezultatima filogenetske analize.

6.6 Prisustvo i raširenost HAV u površinskim i kanalizacionim vodama

6.6.1 Prevalenca HAV u površinskim vodama

Voda za piće i hrana se smatraju glavnim načinima prenosa hepatitisa A na ljude. Hepatitis A virus može dugo da opstane u vodi, hrani i zemljištu. Ovaj virus može da preživi i do 60 dana u vodi iz česme, preko 6 nedelja u rečnoj vodi, preko 8 nedelja u podzemnoj vodi i čak do 30 nedelja u morskoj vodi. U zemljištu HAV je infektivan i nakon 12 nedelja (Rodriguez-Lazaro i sar, 2012). Hepatitis A virusi se prenose fekalno-oralnim putem, najčešće putem zagađene vode i sa jedne osobe na drugu (Cook i Rzezutka 2006.). Prevalenca HAV varira u različitim geografskim područjima, a u endemskim područjima u gradskoj kanalizaciji se



može detektovati tokom cele godine (Pina i sar, 2000). Hepatitis A virus je primarni agens akutnog hepatitisa širom sveta. Ukoliko je ovaj virus prisutan u stolici ljudi, izlivanjem kanalizacije može kontaminirati površinske vode (Pinto i sar, 2010). U ovoj disertaciji HAV nije detektovan niti u jednom od ispitivanih uzoraka vode. Ovaj rezultat bi mogao biti posledica niske prevalencije HAV u periodu uzorkovanja površinskih i otpadnih voda. Prema "Zdravstveni statistički godišnjak Republike Srbije 2013", ukupno 243 slučaja (3,38 slučajeva na 100.000 stanovnika) je prijavljeno u Srbiji u 2013. godini, a od toga, 94 slučaja (4,87 na 100.000 stanovnika) je prijavljeno na teritoriji Vojvodine (<http://vvv.batut.org.rs/download/publikacije/pub2013.pdf>). S obzirom da su rezultati u detekciji ostalih virusa pokazali da se metode koncentrovanja virusa u uzorcima vode i molekularne metode detekcije mogu uspešno koristiti za utvrđivanje prisustva virusa u površinskim vodama, negativan nalaz HAV u površinskim vodama nije rezultat nedostatka primenjenih metoda. Takođe, testiranjem standarda HAV kao i veštačkom kontaminacijom uzorka površinske vode je potvrđeno da je i metodologija za detekciju HAV u površinskim vodama bila uspešna kao i metodologija primenjivana za detekciju ostalih detektovanih virusa. U razvijenim zemljama, učestalost infekcije hepatitis A virusom je niska, dok je u zemljama u razvoju značajno veća (Parasidis i sar, 2013a). Kao i u Srbiji, u Grčkoj i Poljskoj nije potvrđeno prisustvo ovog virusa (Kokkinos i sar, 2012). Međutim, HAV je detektovan u površinskim vodama u Španiji, Koreji, Južnoafričkoj Republici, Bakoku i Singapuru (Kittigul i sar, 2000; Taylor i sar, 2001; Venter i sar, 2007; Aw i Gin, 2011; Chigor i Okoh, 2012b; Lee i sar, 2014; Said i sar, 2014).

6.6.2 Prevalenca HAV u kanalizacionim vodama

Kao ni u uzorcima površinske vode, u ovom istraživanju HAV nije detektovan niti u jednom od ispitivanih uzoraka gradske kanalizacione vode. Razlozi za ovakve rezultate su već pomenuti ranije. Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa rezultatima mnogih drugih studija sprovedenih širom sveta. Slično istraživanje je vršeno u Bangkoku i u 48 uzoraka gradske kanalizacije nije utvrđeno prisustvo HAV RT-PCR metodom (Kittigul i sar, 2000). Interesantno je spomenuti da je u gradu Nokia došlo do kontaminacije vode za piće prečišćenim otpadnim vodama, ali HAV nije detektovan ni u otpadnoj niti u pijaćoj vodi metodom real-time RT-PCR (Maunula i sar, 2009). Za razliku od ovih istraživanja, u mnogim



istraživanjima je detektovan HAV u uzorcima kanalizacionih voda. Ovi rezultati su objavljeni u Grčkoj, Južnoafričkoj Republici, Kairu, Barseloni, Italiji i Francuskoj (Pana i sar, 1987; Hugues i sar, 1988; Schvoerer i sar, 2000; Pinto i sar, 2007; Kokkinos i sar, 2011; Parasidis i sar, 2013b; Said i sar, 2014, Kaas i sar, 2015).

Rezultati u ovoj disertaciji su ukazali na to da HAV ili nije uopšte bio prisutan u humanoj populaciji na ispitivanom području ili ako i jeste bio prisutan, njegova prevalanca kod ljudi na pomenutom području je bila izuzetno niska. Nadzor nad hepatitisom A u Vojvodini traje od 1978. godine, a najviše obolelih je registrovano 1979. godine 2689 osoba. Nakon epidemijskog talasa koji je imao vrh u 2007. godini, sa 539 registrovanih slučajeva, ovo oboljenje se nalazi u interepidemijskoj fazi. Tokom 2012. godine u Vojvodini prijavljeno je 68 slučajeva hepatitisa A. Dijagnoza je laboratorijski potvrđena kod 5 (12,5%) bolesnika (Ilic i sar, 2013). U 2013. godini prijavljena su 94 slučaja hepatitisa A. Najveći broj obolelih je registrovan na teritoriji Južnobanatskog okruga (46,8%) i Srednjobanatskog okruga (44,7%) (Rajcevic i sar, 2014). Tokom 2014. godine u Vojvodini su prijavljena 44 slučaja hepatitisa A. Većina obolelih (70,4%) je registrovana u periodu od januara do marta meseca (Medic i sar, 2015). Hepatitis A u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini ima endemoepidemijski karakter, mada je incidencija značajno redukovana i ima opadajuću tendenciju (Ristic i sar, 2011). Virusni hepatitis A je endemičan na teritoriji Republike Srbije kao posledica neadekvatnih sanitarno-higijenskih uslova u ruralnim predelima. U 2014. godini u Republici Srbiji registrovano je 114 osoba obolelih od akutnog virusnog hepatitisa A sa stopom incidencije 1,59/100.000 populacije, što je duplo manje u odnosu na 2013. godinu, a čak četiri puta manje u odnosu na 2012. godinu (Grgić i sar, 2015) <http://www.batut.org.rs/download/izvestaji/Izvestaj%20o%20zaraznim%20bolestima%202014.pdf> . Rezultati u ovoj disertaciji su u korelaciji sa prethodno navedenim podacima i niskom prevalecom HAV u Vojvodini, u vreme uzorkovanja površinskih i kanalizacionih voda. U periodu uzorkovanja površinskih voda od 2012. do 2014. godine je bio veoma mali broj obolelih osoba od hepatitisa A, što je indirektno potvrđeno dobijenim rezultatima, jer u tom periodu nije detektovan HAV ni u jednom uzorku površinske vode, niti kanalizacije.



6.7 Istovremeno prisustvo više virusa u površinskim i kanalizacionim vodama

U rekama Dunav i Sava utvrđeno je istovremeno prisustvo 6 od 7 virusa (HAdV, NoV GII, NoV GI, HEV, BPyV i PAdV). Ukupno je ispitano 10 lokaliteta ove dve reke, pri čemu su 4 lokaliteta pod uticajem izliva gradske kanalizacije, četiri lokaliteta su gradske plaže, a dva lokaliteta su lovišta divljači. Ovi rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima širom Evrope gde je potvrđeno istovremeno prisustvo ovih nekoliko virusa u uzorcima površinskih voda (Albinana-Gimenez i sar, 2006; Maunula i sar, 2009, 2012; Girones i sar, 2010; Yezli i Otter, 2011; Kozyra i sar, 2011; Kokkinos i sar, 2011, 2012; Rodriguez-Lazaro i sar, 2012; Bofill-Mas i sar, 2013; Chigor i sar, 2014; Kern i sar, 2014).

Istovremeno prisustvo četiri virusa (NoV GII, HAdV, PAdV i BPyV; HAdV, NoV GII, NoV GI i HEV, kao i HAdV, NoV GII, NoV GI su detektovani u reci Krivaja, DTD i KCIII kanalu. Svi uzorci u kojima je potvrđeno prisustvo ovih virusa su bili pod uticajem izliva gradske kanalizacije, naročito reka Krivaja koja je uzorkovana nizvodno od farme goveda i pretpostavlja se da je došlo do fekalnog zagađenja poreklom sa farme.

Istovremeno prisustvo 3 virusa (HAdV, NoV GII i PAdV) je utvrđeno u reci Begej koja je uzorkovana nizvodno od izliva gradske kanalizacije, dok su u Palićkom jezeru i Velikom Bačkom kanalu u Vrbasu istovremeno detektovani HAdV, NoV GII i NoV GI. Ove površinske vode su takodje opterećene izlivima gradskih kanalizacija i antropogenom uticaju.

Prisustvo samo jednog virusa (NoV GII) je utvrđeno u Rakovačkom potoku. Ovaj potok izvire na Fruškoj gori i teče kroz selo Rakovac, pa se pretpostavlja da je do kontaminacije došlo u selu, neposredno kod mesta uzorkovanja.

U parkovima prirode Stara Tisa i Jegrička, i SRP Obedska bara, kao ni u lovištima Plavna i Karađorđevo, nije detektovan niti jedan virus što je i bilo očekivano jer se u ove vode ne ulivaju otpadne vode i pod znatno su manjim antropogenim uticajem u odnosu na vode drugih lokaliteta.

U gradskoj kanalizaciji u gradu Odžaci utvrđeno je istovremeno prisustvo HAdV, NoV GII i NoV GI. U gradskoj kanalizaciji u Subotici i Somboru utvrđeno je istovremeno prisustvo 2 virusa (HAdV i NoV GII; NoV GII i BPyV).

Rezultati su potvrdili prisustvo patogenih virusa kao i zoonotskih agenasa u fekalno kontaminiranim vodama, i odsustvo virusa u uzorcima vode koja nije pod uticajem otpadnih fekalnih voda.



6.8 Kvantifikacija virusa u uzorcima površinskih i kanalizacionih voda

U ovom radu je utvrđena visoka koncentracija virusa u površinskim vodama i uzorcima kanalizacije. Broj PCR detektabilnih jedinica (PDU) virusa u 1L uzorka vode, sa intervalom pouzdanosti (CI - *Confidence interval*) 95%, u uzorcima površinskih voda se kretao od 48 (95%CI: 4-369) do $6,1 \times 10^3$ (95%CI: 406-70.9 $\times 10^3$), a u uzorcima gradske kanalizacije od 96 (95%CI: 8-477) do $6,1 \times 10^3$ (95%CI: 406-70.9 $\times 10^3$). Rezultati ukazuju na postojanje rizika za zdravlje ljudi i životinja i na neophodnost redovnog praćenja stanja kontaminacije površinskih voda. Takođe, rezultati su potvrdili da je neophodno podizanje sistema za prečišćavanje otpadnih voda, kako gradske kanalizacione vode, tako i otpadnih voda sa farmi, klaničnih industrija i sl. U nekim zemljama u Evropi je slična situacija i rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora. Primera radi, u istraživanju Lodder i de Roda Husman (2005) u uzorcima površinskih voda u rekama Maas i Waal broj PDU se kretao od 4 (95%CI: 0,2-38) do $4,9 \times 10^3$ (95%CI: 303-4.6 $\times 10^4$) za norovirus, dok je za rotavirus ta vrednost bila 57 (95%CI: 3-504) - $5,3 \times 10^3$ (95%CI: 333-5,1 $\times 10^4$). U uzorcima kanalizacije ovi autori su utvrdili da se broj PDU norovirusa kretao od 896 (95%CI: 57-7,999) do $8,5 \times 10^5$ (95%CI: 5,3 $\times 10^4$ - 8 $\times 10^6$), a rotavirusa od 339 (95%CI: 16-3,027) do $5,5 \times 10^4$ (95%CI: 12592-4,9 $\times 10^5$). „Recovery“ vrednost za MNoV kao procesnu kontrolu je iznosila od 2,2% do 21,3%, što znači da se u uzorcima moglo detektovati od 2,2% do 21.3% početnog broja virusnih čestica koje su dodate u svaki uzorak. Ovaj podatak se uzimao u obzir kod preračuna broja detektovanih virusnih partikula u ispitivanim uzorcima, a vrednosti prinosa su u skladu sa onim dobijenim u brojnim istraživanjima u svetu (Dahling i Wright, 1986; Lambertini i sar, 2008; Ikner i sar, 2012; Kokkinos i sar, 2012). Takođe, brojna istraživanja su pokazala da tip vode i prisustvo organskih komponenti značajno utiču na prinos virusa prilikom koncentrovanja (Sobsey i Glass, 1984; Sobsey i Jones, 1979; Lance i Gerba, 1984; da Silva i sar, 2011). U odnosu na dobijene rezultate istraživanja, može se sugerisati kao neophodnost da i za buduća istraživanja postupak provere „Recovery“ bude sastavni deo postupka detekcije za svaki virus i svaki uzorak. takođe, potrebno je i dalje optimizovati i unapređivati metode koncentrovanja virusa, kako bi prinos bio što veći.



7 ZAKLJUČAK



Na području Srbije se ne prati prisustvo patogenih virusa ljudi i životinja u površinskim vodama, kao ni u ispustima gradskih kanalizacionih voda u površinske vode, pa čak ni u vodama za piće. U skladu sa tim nije uspostavljena odgovarajuća metodologija niti u jednoj instituciji u Srbiji. Po prvi put u Srbiji, u površinskim vodama na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine, utvrđeno je i analizirano prisustvo virusa ljudi (humanog adenovirusa ((HAdV), norovirusa genogrupe I i II (NoV GI i NoV GII) i hepatitis A virusa (HAV)), virusa životinja (adenovirusa svinja (PAdV) i poliomavirusa goveda (BPyV)), kao i zoonotskih virusa (hepatitis E virusa (HEV)). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je sledeće:

1. Animalni i humani virusi su prisutni u površinskim vodama na području Vojvodine. Na prisustvo virusa ispitano je ukupno 108 uzoraka površinskih (99) i gradskih kanalizacionih voda (9) u različitim sezonama, od oktobra 2012. godine do juna 2014. godine. Utvrđeno je prisustvo skoro svih ispitivanih virusa, odnosno HAdV, NoV GI i GII, PAdV, BPyV i HEV. Jedino HAV nije detektovan niti u jednom od analiziranih uzoraka.

2. Najčešće detektovan virus, odnosno virus sa najvećom prevalencom u ispitanim površinskim vodama i gradskoj kanalizaciji je bio HAdV. Prevalenca HAdV je iznosila 42,4% (42/99) u uzorcima površinskih voda. Prevalenca NoV GII i GI je iznosila 40,4% (40/99) i 15,2% (15/99), PAdV 11,1% (11/99), BPyV 7,1% (7/99), a HEV je bila 3,0% (3/99). U ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacije prevalenca HAdV je iznosila 44,4% (4/9), NoV GII i GI 66,7% (6/9) i 22,2% (2/9). BPyV je detektovan u samo jednom od 9 uzoraka gradske kanalizacije, a niti u jednom nisu detektovani PAdV i HEV. Takođe, hepatitis A virus nije detektovan niti u jednom od analiziranih površinskih voda, niti u uzorcima gradske kanalizacije.

3. U ispitanim površinskim vodama i uzorcima gradske kanalizacije u kojima je detektovano prisustvo virusa je izračunat broj PCR detektabilnih jedinica (PDU) virusa u 1 litru uzorka vode, sa intervalom pouzdanosti (CI) 95%. U uzorcima površinskih voda broj PDU/L utvrđenih virusa se kretao od 48 (95% CI: 4-369) do $6,1 \times 10^3$ (95% CI: $406-70,9 \times 10^3$), a u uzorcima gradske kanalizacije od 96 (95% CI: 8-477) do $6,1 \times 10^3$ (95% CI: $406-70,9 \times 10^3$).



4. Kako bi se dodatno potvrdila uspešnost, osetljivost i specifičnost korišćenih savremenih metoda koncentrovanja i molekularnih metoda detekcije animalnih i humanih virusa u površinskim i kanalizacionim vodama, izvršena je tipizacija jednog broja detektovanih virusa. Analizom sekvenciranih delova genoma HAdV iz 6 uzoraka je potvrđeno da uzorci pripadaju HAdV grupi F, od čega tri uzorka pripadaju tipu 40, a ostala tri tipu 41. Tipizacijom dva uzorka NoV je potvrđeno prisustvo oba genotipa ovog virusa, odnosno i NoV GI i NoV GII. Oba detektovana HEV su tipizirana kao HEV genotip 3, tipizirani deo genoma PAdV je svrstan u PAdV tip 5, a BPyV je analizom sekvence svrstan u BPyV genotip 1.

5. Na osnovu rezultata prinosa procesne kontrole (mišiji norovirus) i detektovanih virusa, jasno je da se savremene metode koncentrovanja virusa iz uzoraka vode (filtracija kroz staklenu vunu, elucija goveđim ekstraktom i koncentrovanje centrifugiranjem uz izmenu pH vrednosti) i korišćene molekularne metode detekcije (ekstrakcija nukleinskih kiselina pomoću magnetnih čestica, real-time RT-PCR i real-time PCR (RT-qPCR i qPCR)) mogu veoma uspešno koristiti za utvrđivanje virusne kontaminacije površinskih voda. Od svih ispitivanih virusa, jedino HAV nije detektovan niti u jednom od analiziranih površinskih voda, niti u uzorcima gradske kanalizacije. Međutim, testiranjem standarda HAV, kao i veštačkom kontaminacijom uzorka površinske vode, potvrđeno je da je metodologija i za detekciju HAV u površinskim vodama bila adekvatna, kao i za detekciju ostalih detektovanih virusa.

6. Savremene metode koncentrovanja i detekcije virusa u uzorcima površinskih voda se veoma uspešno mogu koristiti za rutinski nadzor virusološke ispravnosti površinskih voda, a naročito ukoliko to u budućnosti postane zahtev kontrole kontaminacije životne sredine.

7. Rezultati indirektno ukazuju na prisustvo infekcija ljudi i životinja detektovanim virusima na ispitivanom području. Prisustvo virusa u površinskim vodama i uzorcima gradske kanalizacije ukazuje da su ispitivani virusi HAdV, norovirus GI i GII, adenovirus svinja, poliomavirus goveda i hepatitis E virus cirkulisali u populaciji ljudi i životinja u periodu od oktobra 2012. do juna 2014. godine. Jedino HAV nije detektovan niti u



površinskim, niti u kanalizacionim vodama, što ukazuje na činjenicu da je prevalencije HAV u humanoj populaciji u ispitivanom periodu na ispitivanom bila izuzetno niska i ispod granice detekcije.

8. Broj i prevalencija detektovanih patogenih enteričkih vrsta virusa u površinskim vodama u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini (Srbija) su nedvosmisleno potvrdili da postoji rizik za zdravlje životinja i ljudi na području koje gravitira ispitanim površinskim vodama. Rizik za javno zdravlje i zdravlje životinja je posebno značajan na područjima i lokalitetima gde se ispitivane površinske vode koriste u poljoprivredne i rekreativne svrhe.

Rezultati istraživanja ukazuju na neophodnost kontinuiranog praćenja virusološke ispravnosti površinskih voda, a u cilju pravovremenog upozoravanja stanovništva i prevencije infekcija. Rezultati takođe ukazuju na neophodnost prečišćavanja otpadnih voda u cilju smanjenja virusnog opterećenja površinskih voda na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine.



8 LITERATURA



1. Acimovic, S. & Leles, B. (2013). Uperedna analiza kvaliteta vode krivaje na profilima mali idoš i Srbobran sa aspekta zagađenja nutrijentima. *Vodoprivreda*, 45, 261-263.
2. Ahmad, T., Anjum, T., Zaidi, N.S.S., Ali, A., Waqas, M., Afzal, M.S., & Arshad, N. (2015). Frequency of hepatitis E and Hepatitis A virus in water sample collected from Faisalabad, Pakistan. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22 (4), 661–664.
3. Ahmad, T., Waheed, Y., Tahir, S., Safi, S.Z., Fatima, K., Afzal, M.S., Farooqi, Z.R., & Qadri, I. (2010). Frequency of HEV contamination in sewerage waters in Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4 (12), 842-845.
4. Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F., & Girones, R. (2006). Distribution of Human Polyomaviruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the Environment and in a Drinking-Water Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*, 40 (23), 7416-7422.
5. Allard, A., Albinsson, B., & Wadell, G. (2001). Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (2), 498–505.
6. Allen, D.J., Iturriza-Gómara, M., & Brown, D.W.G. (2013). Advances in understanding of norovirus as a food and waterborne pathogen. In: *Viruses in food and water: risks, surveillance and control* (N. Cook, Ed.), pp. 319-348. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
7. Amdiouni, H., Faouzi, A., Fariat, N., Hassar, M., Soukri, A., & Nourlil, J. (2012). Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco. *Letters in Applied Microbiology*, 54, 359–366.
8. Anitã, A., Gorgan, L., Anitã, D., Oslobanu, L., Pavio, N., & Savutã, G. (2014). Evidence of hepatitis E infection in swine and humans in the East Region of Romania. *International Journal of Infectious Diseases*, 29, 232–237.
9. Ansorge, W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25 (4), 195-203.
10. Atmar, R.L. (2010). Noroviruses: State of the Art. *Food and Environmental Virology*, 2, 117–126.
11. Atwill, E.R., Li, X., Grace D. & Gannon, V. (2012). Zoonotic waterborne pathogen loads in livestock. In: *Animal Waste, Water Quality and Human Health*, (Al Dufour, Jamie Bartram, Robert Bos and Victor Gannon Ed.), pp. 73-114. World Health Organization, IWA Publishing, UK.
12. Aw, T.G. & Gin, K.Y.-H. (2011). Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface waters of tropical urban catchments. *Journal of Applied Microbiology*, 110 (4), 903–914.
13. Aw, T.G., Gin, K.Y.-H., Oon, L.L.E., Chen, E.X., & Woo, C.H. (2009). Prevalence and Genotypes of Human Noroviruses in Tropical Urban Surface Waters and Clinical Samples in Singapore. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (15), 4984-4992.
14. Ayukekbong, J.A., Mesumbe, H.N., Oyero, O.G., Lindh, M., & Bergström, T. Role of noroviruses as aetiological agents of diarrhoea in developing countries. *J Gen Virol.*, 96 (8), 1983-1999.
15. Baert, L., Uyttendaele, M., Van Coillie, E., & Debevere, J. (2008). The reduction of murine norovirus 1, B. fragilis HSP40 infecting phage B40-8 and E. coli after a mild thermal pasteurization process of raspberry puree. *Food Microbiology*, 25 (7), 871-874.
16. Barardi, C.R.M., Viancelli, A., Rigotto, C., Corrêa, A.A., Moresco, V., Souza, D.S.M., ElMahdy, M.E.I., Fongaro, G., Pilotto, M.R., & Nascimento, M.A. (2012). Monitoring viruses



- in environmental samples. *International Journal of Environmental Science and Engineering Research (IJESER)*, 3 (3), 62-79.
17. Barkely, T. & Prescott, A.B. (2008). Trends in water resources research. New York, ISBN: 978-1-604-56038-1.
 18. Bartram, J. (2012). Introduction. In: *Animal Waste, Water Quality and Human Health*, (Al Dufour, Jamie Bartram, Robert Bos and Victor Gannon Ed.), pp. 1-16. World Health Organization, IWA Publishing, UK.
 19. Beji-Hamza, A., Khelifi-Gharbi, H., Hassine-Zafrane, M., Della Libera, S., Iaconelli, M., Muscillo, M., Petricca, S., Ciccaglione, A.R., Bruni, R., Taffon, S., Equestre, M., Aouni, M., & La Rosa, G. (2014). Qualitative and Quantitative Assessment of Hepatitis A Virus in Wastewaters in Tunisia. *Food and Environmental Virology*, 6, 246–252.
 20. Ben Salem, N., Pérez de Val, B., Martin, M., Moens, U., Ehlers, B. (2016). Genome Sequence of Bovine Polyomavirus 1 Detected in a Salers Cow (*Bos taurus*) from Catalonia, Spain. *Genome Announc.*, 28, 4 (1). pii: e01658-15.
 21. Blacklow, N.R. (1996). Norwalk Virus and Other Caliciviruses In: *Medical Microbiology*. 4th edition. (Baron S., Ed.), Chapter 65. University of Texas Medical Branch at Galveston.
 22. Blanco Fernández, M.D., Torres, C., Martínez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Barril, P.A., Isa, M.B., Campos, R.H., Nates, S.V., & Mbayed, V.A. (2011). Genetic and evolutionary characterization of norovirus from sewage and surface waters in Córdoba City, Argentina. *Infect Genet Evol.*, 11 (7), 1631-1637.
 23. Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., & Girones, R. (2006). Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (12), 7894–7896.
 24. Bofill-Mas, S., Calgua, B., Clemente-Casares, P., La Rosa, G., Iaconelli, M., Muscillo, M., Rutjes, S., de Roda Husman, A.M., Grunert, A., Graber, I., Verani, M., Carducci, A., Calvo, M., Wyn-Jones, P., & Girones, R. (2010). Quantification of Human Adenoviruses in European Recreational Waters. *Food and Environmental Virology*, 2, 101–109.
 25. Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., & Girones, R. (2013). Quantification of Human and Animal Viruses to Differentiate the Origin of the Fecal Contamination Present in Environmental Samples. *BioMed Research International*, 2013, 192089, 11 pages.
 26. Bolin, C., Brown, C., & Rose, J. (2004). Emerging zoonotic diseases and water. In: *Waterborne Zoonoses Identification, Causes, and Control*. (J.A. Cotruvo, A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D.O. Cliver, G.F. Craun, R. Fayer and V.P.J. Gannon Ed.), pp. 19-26. World Health Organization, IWA Publishing, UK.
 27. Bosch, A. (1998). Human enteric viruses in the water environment. A minireview. *International Microbiology*, 1, 191-196.
 28. Bosch, A., Guix, S., Sano, D., & Pinto, R.M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 295–301.
 29. Bosch, A., Pintó, R.M., & Abad, F.X. (1995). Differential accumulation and depuration of human enteric viruses by mussels. *Water Science and Technology*, 31 (5-6), 447–451.
 30. Bosch, A., Pintó, R.M., & Abad, F.X. (2006). Survival and transport of enteric viruses in the environment. In *“Viruses in Food”*, S. M. Goyal (Ed.). Food Microbiology and Food Safety Series. Springer, New York, NY, pp 151-187.
 31. Bosch, A., Sánchez, G., Abbaszadegan, M., Carducci, A., Guix, S., Le Guyader, F.S., Netshikweta, R., Pintó, R.M., van der Poel, W.H.M., Rutjes, S., Sano, D., Taylor, M.B., van



- Zyl, W.B., Rodriguez-Lazaro, D., Kovač K., & Sellwood, J. (2011). Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food. *Food Analytical Methods*, 4 (1), 4-12.
32. Boye, M., Kamstrup, S., & Dalgaard, K. (1991). Specific sequence amplification of bovine virus diarrhea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Veterinary Microbiology*, 29, 1-13.
33. Buitrago, D., Cano-Gomez, C., Agüero, M., Fernandez-Pacheco, P., Gomez-Tejedor, C., & Jimenez-Clavero, M.A. (2010). A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. *J Vet Diagn Invest*, 22, 763–766.
34. Calgua, B., Carratalà, A., Guerrero-Latorre, L., de Abreu Corrêa, A., Kohn, T., Sommer, R., & Girones, R. (2014). UVC Inactivation of dsDNA and ssRNA Viruses in Water: UV Fluences and a qPCR-Based Approach to Evaluate Decay on Viral Infectivity. *Food Environ Virol.*, 6 (4), 260-268.
35. Campos, C.J.A., Avant, J., Lowther, J., Till, D., & Lees, D. (2013). Levels of Norovirus and E. coli in Untreated, Biologically Treated and UV-Disinfected Sewage Effluent Discharged to a Shellfish Water. *Journal of Water Resource and Protection*, 5, 978-982.
36. Cao, D., & Meng, X.-J. (2012). Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerging Microbes and Infections*, 1, e17.
37. Carducci, A., Battistini, R., Rovini, E. & Verani, M. (2009). Viral removal by wastewater treatment: monitoring of indicators and pathogens. *Food and Environmental Virology*, 1, 85-91.
38. Carratala, A., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Guerrero-Latorre, L., Sommer, R., & Girones, R. (2013). Environmental effectors on the inactivation of human adenoviruses in water. *Food and Environmental Virology*, 5, 203–214.
39. Chigor, V.N., & Okoh, A.I. (2012a). Quantitative Detection and Characterization of Human Adenoviruses in the Buffalo River in the Eastern Cape Province of South Africa. *Food and Environmental Virology*, 4, 198–208.
40. Chigor, V.N., & Okoh, A.I. (2012b). Quantitative RT-PCR Detection of Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Source Water Dams in the Eastern Cape Province of South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9, 4017-4032.
41. Chigor, V.N., Sibanda, T., & Okoh A.I. (2014). Assessment of the risks for human health of adenoviruses, hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and three source water dams in the Eastern Cape. *Food Environ Virol.*, 6 (2), 87-98.
42. Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martín, M., Bofill-Mas, S., & Girones, R. (2003). Hepatitis E Virus Epidemiology in Industrialized Countries. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 4, 448-454.
43. Cliver, D.O. (2008). Historic overview of food virology. In: *Food-Borne Viruses: Progress and Challenges* (Koopmans MPG, Cliver DO & Bosch A, Eds), pp. 1–28. ASM Press, Washington, DC.
44. Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350, 91-92.
45. Cook, N., & Rzezutka, A. (2006). Hepatitis viruses. In: *Emerging Foodborne Pathogens* (Y. Motarjemi and M. Adams, Eds.), pp: 282 – 308. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
46. Corsi, S.R., Borchardt, M.A., Carvin, R.B., Burch, T.R., Spencer, S.K., Lutz, M.A., McDermott, C.M., Busse, K.M., Kleinheinz, G.T., Feng, X., & Zhu, J. (2015). Human and Bovine Viruses and Bacteria at Three Great Lakes Beaches: Environmental Variable Associations and Health Risk. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 987–995.



47. Corsi, S.R., Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Hughes, P.E., & Baldwin, A.K. (2014). Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: hydrologically relevant representation and relations with environmental variables. *Sci Total Environ.*, 490, 849-860.
48. Costafreda, M.I., Bosch, A., & Pinto, R.M. (2006). Development, evaluation and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for the quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3846–3855.
49. Craven, H., Duffy, L., Fegan, N., & Hillier, A. (2009). Semi dried tomatoes and hepatitis A virus. *A report for the Department of Health, Victoria.*
50. Croci, L., Dubois, E., Cook, N., de Medici, D., Schultz, A.C., China, B., Rutjes, S.A., Hoorfar, J., & Van der Poel, W.H.M. (2008). Current methods for extraction and concentration of enteric viruses from fresh fruit and vegetables: towards international standards. *Food Anal Methods*, 1, 73–84.
51. D’Agostino, M.S. (2013). Quality control in the analytical laboratory: analysing food- and waterborne viruses. In: *Viruses in food and water. Risks, surveillance and control* (N. Cook, Ed.), pp. 126-138. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
52. Dahling, D.R. & Wright, B.A. (1986). Recovery of Viruses from Water by a Modified Flocculation Procedure for Second-Step Concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 6, 1326-1331.
53. da Silva, A.K., Kavanagh, O.V., Estes, M.K., & Elimelech, M. (2011). Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environ. Sci. Technol.* 45 (2), 520-526.
54. da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., & Le Guyader, F.S. (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 (24), 7891-7897.
55. Dalla Vecchia, A., Fleck, J.D., Kluge, M., Comerlato, J., Bergamaschi, B., Luz, R.B., Arantes, T.S., Silva, J.V.S., Thewes, M.R., & Spilki, F.R. (2012). Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, southern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 72 (4), 839-846.
56. Dalla Vecchia, A., Rigotto, C., Staggemeier, R., Soliman, M.C., Gil de Souza, F., Henzel, A., Santos, E.L., do Nascimento, C.A., de Quevedo, D.M., Fleck, J.D., Heinzemann, L.S., de Matos Almeida, S.E., & Spilki, F.R. (2015). Surface water quality in the Sinos River basin, in Southern Brazil: tracking microbiological contamination and correlation with physicochemical parameters. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 22 (13), 9899-9911.
57. Dalton, H.R, Stableforth, W., Thurairajah, P., Hazeldine, S., Remnarace, R., Ysama, W., Farrington, L., Hamad, N., Sieberhagen, C., Ellis, V., Mitchell, J., Hussaini, S.H., Banks, M., Ijaz, S., Bendall, R.P. (2008). Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20, 784-790.
58. Das, S.R., Halpin, R.A., Mohan, M., Fedorova, N., Tsitin, T., Puri, V., Stockwell, T., Amedeo, P., Bishop, B., Gupta, N., Hoover, J., Katzel, D., Schobel, S., Shrivastava, S., Ahmed, T., Haque, R., Knobler, S., Miller, M., Wentworth, D.E. & Nelson, M. (2015). Direct Submission: Norovirus Hu/GII/BG1C0405/2012/BGD, complete genome. Unpublished. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ685412>



59. Davison, A.J., Benko, M., & Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol.*, 84 (Pt 11), 2895-2908.
60. Davison, A.J., Telford, E.A., Watson, M.S., McBride, K., Mautner, V. (1993). The DNA sequence of adenovirus type 40. *J Mol Biol.*, 234 (4), 1308-1316.
61. Devakirubakaran, J.S. & Senthilkumar, K. (2015). Direct Submission: Adeno virus from water sample in India. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/927092533/>
62. Diez-Valcarce, M., Kovač, K., Cook, N., Rodriguez-Lazaro, D., & Hernández, M. (2011). Construction and analytical application of internal amplification controls (IAC) for detection of food supply chain-relevant viruses by real-time PCR-based assays. *Food Analytical Methods*, 4, 437-445.
63. Dufour, A., Wade, T.J., & Kay, D. (2012). Epidemiological studies on swimmer health effects associated with potential exposure to zoonotic pathogens in bathing beach water – a review. In: *Animal Waste, Water Quality and Human Health*, (Al Dufour, Jamie Bartram, Robert Bos and Victor Gannon Ed.), pp. 415-428. World Health Organization, IWA Publishing, UK.
64. EFSA: Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011). Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses, *EFSA Journal*, 9 (7), 2190, pp. 96.
65. Emerson, S.U. & Purcell, R.H. (2004). Running like Water - The Omnipresence of Hepatitis E. *The New England Journal of Medicine*, 351, 23, 2367-2368.
66. Erker J.C., Leary T.P., Desai S.M., Chalmers, M. L. & Mushahwar I. K. (1999). Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *Journal of General Virology*, 80, 1743–1750.
67. Fares, A. (2015). Seasonality of Hepatitis: A Review Update. *J Family Med Prim Care.*, 4(1), 96–100.
68. Fauci, V.L., Sindoni, D., Grillo, O.C., Calimeri, S., Lo Giudice, D., & Squeri, R. (2010). Hepatitis E virus (HEV) in sewage from treatment plants of Messina University Hospital and of Messina city council. *J prev med hyg*, 51, 28-30.
69. Fong, T.T., & Lipp, E.K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (2), 357–371.
70. Fong, T.T., Phanikumar, M.S., Xagorarakis, I., & Rose, J.B. (2010). Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan River. *Applied and environmental microbiology*, 76 (3), 715–723.
71. Forgach, P., Bakonyi, T., Szucs, G. & Reuter, G. (2009). Direct Submission: Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU718647>
72. Foy, H.M., Cooney, M.K., & Hatlen, J.B. (1968). Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. *Archives of Environmental Health*, 17, 795–802.
73. Franca, L.T.C., Carrilho, E., & Kist, T.B.L (2009). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35 (2), 169–200.
74. Fumian, T.M., Vieira, C.B., Leite, J.P.G., & Miagostovich, M.P. (2013). Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water and Health*, 11 (1), 110-119.
75. Gabrieli, R., Maccari, F., Ruta, A., Pana, A., & Divizia, M. (2009). Norovirus Detection in Groundwater. *Food and Environmental Virology*, 1, 92–96.



76. Garcia, L.A., Viancelli, A., Rigotto, C., Pilotto, M.R., Esteves, P.A., Kunz, A., & Barardi, C.R. (2012). Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil. *J Water Health*, 10 (3), 445-52.
77. Gentry-Shields, J., Myers, K., Pisanic, N., Heaney, C., & Stewart, J. (2015). Hepatitis E virus and coliphages in waters proximal to swine concentrated animal feeding operations. *Science of the Total Environment*, 505, 487–493.
78. Girones, R., & Bofill-Mas, S. (2013). Virus indicators for food and water. In: *Viruses in food and water. Risks, surveillance and control*, (N. Cook, Ed.), pp. 483-509. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
79. Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa Ade, A., Hundesa, A., Carratala, A., & Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44 (15), 4325-4339.
80. Girones, R. (2006). Tracking viruses that contaminate environments using PCR to track stable viruses provides an effective means for monitoring water quality for environmental contaminants. *Microbe*, 1, 19-25.
81. Glasgow, J.N., Everts, M., & Curiel, D.T. (2006). Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 13, 830–844.
82. Grgic, B., Drakulović, M., Dimitrijević, D., Milinković, M., Plavša, D., Simić, D., Ilic Vlatković, V., Radmanović, M., Rokvić, R., & Lončarević, G. (2015). Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2014. godinu. Institut za javno zdravlje Srbije “Milan Jovanović Batut”.
83. Greening, G., Hewitt, J., Lewis, G. (2002). Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J. Appl. Microbiol*, 93,745–750.
84. Grimwood, K., Carzino, R., Barnes, G.L. & Bishop, R.F. (1995). Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 131–136.
85. Guardado-Calvo, P., Muñoz, E.M., Llamas-Saiz, A.L., Fox, G.C., Kahn, R., Curiel, D.T., Glasgow, J.N., & van Raaij, M.J. (2010). Crystallographic Structure of Porcine Adenovirus Type 4 Fiber Head and Galectin Domains. *Journal of virology*, 84 (20), 10558–10568.
86. Hammond, J.M., & Johnson, M.A. (2005). Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics. *The Veterinary Journal*, 169, 17–27.
87. Hamza, I.A., Jurzik, L., Überlab, K., & Wilhelma, M. (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 424– 436.
88. Haramoto, E., Katayama, H., & Ohgaki, S. (2004). Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl Environ Microbiol.*, 70 (4), 2154-2160.
89. Haramoto, E., Katayama, H., Utagawa, E., & Ohgaki S. (2009). Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J Virol Methods.*, 160 (1-2), 206-209.
90. Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Katayama, H., Asami, M., & Akiba, M. (2012). Occurrence of viruses and protozoa in drinking water sources of Japan and their relationship to indicator microorganisms. *Food and Environmental Virology*, 4 (3), 93-101.
91. Hardy, M.E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253, 1–8.
92. Harrach, B., Benkö, M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones M.S., Kajon, A., Lehmkuhl, H.D., Mautner, V., Mittal, S.K. & Wadell, G. (2011). Family Adenoviridae. In: *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report*



- of the international committee on taxonomy of viruses (A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz, Eds.), pp. 125–141. San Diego: Elsevier.
93. Hassine-Zaafreane, M., Sdiri-Loulizi, K., Kaplon, J., Ben Salem, I., Pothier, P., Aouni, M., & Ambert-Balay, K. (2014). Molecular Detection of human Noroviruses in Influent and Effluent Samples From Two Biological Sewage Treatment Plants in the Region of Monastir, Tunisia. *Food and Environmental Virology*, 6 (2), 125-131.
94. Hazam, R.K., Singla, R., Kishore, J., Singh, S., Gupta, R.K., & Kar, P. (2010). Surveillance of hepatitis E virus in sewage and drinking water in a resettlement colony of Delhi: what has been the experience? *Arch Virol*, 155, 1227–1233.
95. He, J.W. & Jiang, S. (2005). Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2250-2255.
96. Hellmér, M., Paxéus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergström, T., & Nordera, H. (2014). Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 6771–6781.
97. Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., & Allard, A.K. (2002). Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9), 4523-4533.
98. Hill, V.R., Mull, B., Jothikumar, N., Ferdinand, K., & Vinje, J. (2010). Detection of GI and GII Noroviruses in Ground Water Using Ultrafiltration and TaqMan Real-time RT-PCR. *Food Environ Virol.*, 2, 218–224.
99. Hill, W.F.Jr., Elmer, W. And, A., & Benton, W.H. (1971). Detection of viruses in water: a review of methods and application. *Water Research*, 5, 967-995.
100. Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M., & van Duynhoven, Y.T.H.P. (2004). Norovirus Outbreak among Primary Schoolchildren Who Had Played in a Recreational Water Fountain. *The Journal of Infectious Diseases*, 189, 699–705.
101. Hogema, B.M., Molier, M. and Zaaijer, H.L. (2015). Direct submission: HEV in the Netherlands. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR362757>
102. Hosmillo, M., Jeong, Y.J., Kim, H.J., Park, J.G., Nayak, M.K., Alfajaro, M.M., Collantes, T.M., Park, S.J., Ikuta, K., Yunoki, M., Kang, M.I., Park, S.I., & Cho, K.O. (2010). Molecular detection of genotype 3 porcine hepatitis E virus in aborted fetuses and their sows. *Arch Virol.*, 155 (7), 1157-1161.
103. Hryniszyn, A., Skonieczna, M., & Wiszniowski, J. (2013). Methods for Detection of Viruses in Water and Wastewater. *Advances in Microbiology*, 3, 442-449.
104. Hugues, B., Pietri, C., Puel, D., Crance, J.M., Cini, C. & Deloince, R. (1988). Research of enterovirus, hepatitis A virus in a bathing area over a six-month-period and their salubrity impact. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene*, 185 (6), 560–568.
105. Hundesa, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodriguez-Manzano, J., Bach, A., Casas, M., & Girones, R. (2010). Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *Journal of Virological Methods*, 163 (2), 385–389.
106. Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Albinana-Gimenez, N., Rodriguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Sunen, E., & Rosina Girones, R. (2009). Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *Journal of Virological Methods*, 158 (1-2), 130-135.



107. Hundesa, A., Maluquer De Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., & Girones, R. (2006). Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Applied and environmental microbiology*, 72 (12), 7886–93.
108. Hussain, Z. (2011). Hepatitis A: Clinical, Epidemiological and Molecular Characteristics. In: *Viral Hepatitis - Selected Issues of Pathogenesis and Diagnostics*, (S.D.Mukomolov, Ed.), Ch. 6, pp. 127-140. InTech, China.
109. Hussain, Z. (2013). Genomic Heterogeneity of Hepatitis Viruses (A-E): Role in Clinical Implications and Treatment. In: *Practical Management of Chronic Viral Hepatitis*, G. Serviddio (Ed.), Ch. 2, pp. 19-56. InTech, China.
110. Iaconelli, M., Purpari, G., Della Libera, S., Petricca, S., Guercio, A., Ciccaglione, A.R., Bruni, R., Taffon, S., Equestre, M., Fratini, M., Muscillo, M., & La Rosa, G. (2015). Hepatitis A and E Viruses in Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. *Food and Environmental Virology*, 7 (4), 316-324.
111. Idolo, A., Serio, F., Lugoli, F., Grassi, T., Bagordo, F., Guido, M., Privitera, G., Lobreglio, G., & De Donno, A. (2013). Identification of HEV in symptom-free migrants and environmental samples in Italy. *Journal of Viral Hepatitis*, 20, 438–443.
112. Ikner, L.A., Gerba, C.P., & Bright, K.R. (2012). Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. *Food Environ Virol.*, 4, 41–67.
113. Ilic, S. (2014). Crevne I zarazne bolesti. In: *Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2013. godina* (Petrovic, V., ed.), Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, ISSN 1452-8916.
114. Ilic, S. (2015). Crevne I zarazne bolesti. In: *Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2014. godina* (Petrovic, V., ed.), pp. 26, Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, ISSN 1452-8916.
115. Ilic, S., Đuric, P., & Zobenica, R. (2013). Virusni hepatitis. In: *Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2012. godina* (Petrovic, V., ed.), Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, ISSN 1452-8916.
116. Ilic, S., & Markovic, E. (2013). Crevne I zarazne bolesti. In: *Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2012. godina* (Petrovic, V., ed.), Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, ISSN 1452-8916.
117. Ilic, S., & Strbac, M. (2015). Registrovane epidemije zaraznih bolesti u AP Vojvodini u 2014. godini. In: *Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2014. godina* (Petrovic, V., ed.), Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, ISSN 1452-8916.
118. Ishiko, H., Shimada, Y., Konno, T., Hayashi, A., Ohguchi, T., Tagawa, Y., Aoki, K., Ohno, S., & Yamazaki, S. (2008). Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Microbiol.*, 46 (6), 2002-2008.
119. Ivanova, A., Tefanova, V., Reshetnjak, I., Kuznetsova, T., Geller, J., Lundkvist, A., Janson, M., Neare, K., Velstrořm, K., Jokelainen, P., Lassen, B., Hutt, P., Saar, T., Viltrop, A., & Golovljova, I. (2015). Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia. *Food and Environmental Virology*, 7 (4), 403-412.
120. Jemeršić, L., Roić, B., Balatinec, J., & Keros, T. (2010). Hepatitis E. Jesmo li ugroženi? *Veterinarska stanica*, 41 (5), 381-382.
121. Jerant Patić, V., Patić, A., Milošević, V., Hrnjaković Cvjetković, I., Radovanov, J., Kovačević, G., Medic, D., & Gusman, V. (2009). Adenovirus Infections/Adenovirusne Infekcije. *Medical review/Medicinska revija*, 1 (4), 9-14.
122. Jiang, S.C. (2006). Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 7132-7140.



123. Johne, R., Buck, C.B., Allander, T., Atwood, W.J., Garcea, R.L., Imperiale, M.J., Major, E.O., Ramqvist, T., & Norkin, L.C. (2011). Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol.*, 156 (9), 1627-1634.
124. Jothikumar N., Aparna, K., Kamatchiammal, S., Paulmurugan, R., Saravanadevi, S., & Khanna, P. (1993). Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2558–2562.
125. Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., & Hill, V.R. (2006). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods*, 131 (1), 65-71.
126. Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D., & Robertson, B.H. (2005). Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid Detection of Hepatitis A Virus. *Applied and environmental microbiology*, 71 (6), 3359–3363.
127. Jovanovic Galovic, A., Bijelovic, S., Milosevic, V., Hrnjaković Cvjetkovic, I., Popović, M., Kovačević, G., Radovanov, J., Dragić, N., & Petrović, V. (2016). Testing for viral material in water of public bathing areas of the Danube during summer, Vojvodina, Serbia, 2014. *Euro Surveill.*, 14, 21(15).
128. Kaas, L., Gourinat, A.C., Urbès, F., & Langlet, J. (2015). A 1-Year Study on the Detection of Human Enteric Viruses in New Caledonia. *Food Environ Virol.*, Dec 15. [Epub ahead of print].
129. Kajon, A.E., Lamson, D., Shudt, M., Oikonomopoulou, Z., Fisher, B., Klieger, S., St George, K., & Hodinka, R.L. (2014). Identification of a novel intertypic recombinant species D human adenovirus in a pediatric stem cell transplant recipient. *J Clin Virol.*, 61 (4), 496-502.
130. Kamar, N., Dalton, H.R., Abravanel, F., & Izopet, J. (2014). Hepatitis E Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 7 (1), 116 –138.
131. Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., & Chanock, R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.*, 10, 1075-81.
132. Kasorndorkbua, C., Opriessnig, T., Huang, F.F., Guenette, D.K., Thomas, P.J., Meng, X.-J., & Halbur, P.G. (2005). Infectious Swine Hepatitis E Virus Is Present in Pig Manure Storage Facilities on United States Farms, but Evidence of Water Contamination Is Lacking. *Applied and environmental microbiology*, 17 (12), 7831–7837.
133. Katayama H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., & Ohgaki, S. (2008). One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.*, 42, 1441–1448.
134. Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol.*, 68, 1033–9.
135. Kern, A. (2014). Presence of human pathogen viruses in Hungarian surface and recreational waters. PhD thesis. Department of Water Microbiology. National Institute for Environmental Health, Budapest.
136. Kern, A., Kadar, M., Szomor, K., Berencsi, G., Kapusinszky, B., & Vargha, M. (2013). Detection of enteric viruses in Hungarian surface waters: first steps towards environmental surveillance. *Journal of Water and Health*, 11 (4), 772–782.
137. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.



138. Kitajima, M., Matsubara, K., Sour, S., Haramoto, E., Katayama, H., & Ohgaki, S. (2009). First detection of genotype 3 hepatitis E virus RNA in river water in Cambodia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103, 955–957.
139. Kittigul, L., Raengsakulrach, B., Siritantikorn, S., Kanyok, R., Utrarachkij, F., Diraphat, P., Thirawuth, V., Siripanichgon, K., Pungchitton, S., Chitpirom, K., Chaichantanakit, N., & Vathanophas, K. (2000). Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewage and water samples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 31 (1), 41-6.
140. Kiulia, N.M., Mans, J., Mwenda, J.M., & Taylor, M.B. (2014). Norovirus GII.17 Predominates in Selected Surface Water Sources in Kenya. *Food Environ Virol.*, 6, 221–231.
141. Koh, S.J., Cho, H.G., Kim, B.H., & Choi, B.Y. (2011). An Outbreak of Gastroenteritis Caused by Norovirus-Contaminated Groundwater at a Waterpark in Korea. *J Korean Med Sci*, 26, 28-32.
142. Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazić, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., Rzeżutka, A., Petrovic, T., & Vantarakis, A. (2012). Harmonised Investigation of the Occurrence of Human Enteric Viruses in the Leafy Green Vegetable Supply Chain in Three European Countries. *Food and Environmental Virology*, 4 (4), 179-191.
143. Kokkinos, P., Syngouna, V.I., Tselepi, M.A., Bellou, M., Chrysikopoulos, C.V., & Vantarakis, A. (2015). Transport of Human Adenoviruses in Water Saturated Laboratory Columns. *Food and Environmental Virology*, 7 (2), 122-131.
144. Kokkinos, P.A., Ziros, P.G., Mpalasopoulou, A., Galanis, A., & Vantarakis, A. (2011). Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Virology Journal*, 8, 195.
145. Kozyra, I., Kaupke, A., & Rzeżutka, A. (2011). Seasonal Occurrence of Human Enteric Viruses in River Water Samples Collected from Rural Areas of South-East Poland. *Food and Environmental Virology*, 3, 115–120.
146. Kureljušić, B., Ivetić, V., Savić, B., Kureljušić, J., & Jezdimirović, N. (2012). Viral hepatitis E – a disease of humans and animals. *Veterinarski glasnik*, 66 (5-6), 449-462.
147. La Rosa, G., Fratini, M., Della Libera, S., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2012). Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann Ist Super Sanità*, 48 (4), 397-406.
148. La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2010). Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Ann Ist Super Sanità*, 46 (3), 266-273.
149. Lambertini, E., Spencer, S.K., Bertz, P.D., Loge, F.J., Kieke, B.A., & Borchardt, M.A. (2008). Concentration of Enteroviruses, Adenoviruses, and Noroviruses from Drinking Water by Use of Glass Wool Filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 10, 2990–2996.
150. Lamson, D.M., Shudt, M.D., Kajon, A.E. & St George, K. (2014). Direct Submission: Whole genome sequence analysis of Human Adenoviruses, Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/648174154/>
151. Lance, J.C. & Gerba, C.P. (1984). Effect of ionic composition of suspending solution on virus adsorption by a soil column. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (3), 484-488.
152. Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. & Carter, M.J. (2004). Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 127–136.



153. Lee, C., Lee, S.-H., Han, E., & Kim, S.J. (2004). Use of Cell Culture-PCR Assay Based on Combination of A549 and BGMK Cell Lines and Molecular Identification as a Tool To Monitor Infectious Adenoviruses and Enteroviruses in River Water. *Applied and environmental microbiology*, 70 (11), 6695–6705.
154. Lee, G.C., Jheong, W.H., Jung, G.S., Oh, S.A., Kim, M.J., Rhee, O.J., Park, S., & Lee, C.H. (2012). Detection and molecular characterization of human noroviruses in Korean groundwater between 2008 and 2010. *Food Environ Virol.*, 4 (3), 115-23.
155. Lee, G.C., Kim, M.J., Nam, S, & Lee, C.H. (2014). Incidence and molecular characterization of hepatitis A viruses in Korean surface water between 2007 and 2010. *Microbiol Immunol.*, 58 (6), 342-51.
156. Lee, S.-H., Lee, C., Lee, K.W., Cho, V., & Kim, S.-J.(2005). The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture–multiplex-nested PCR procedure. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1020–1029.
157. Legrand-Abravanel, F., Mansuy, J.M., Dubois, M., Kamar, N., Peron, J.M., Rostaing, L., & Izopet, J. (2009). Hepatitis E virus genotype 3 diversity, France. *Emerg Infect Dis.*, 15 (1), 110-114.
158. Li, T.-C., Yang, T., Shiota, T., Yoshizaki, S., Yoshida, H., Saito, M., Imagawa, T., Malbas, F.F., Lupisan, S.P., Oshitani, H., Wakita, T., & Ishii, K. (2014). Short Report: Molecular Detection of Hepatitis E Virus in Rivers in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 90 (4), 764–766.
159. Lodder, W.J. & de Roda Husman, A.M. (2005). Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in the Netherlands. *Applied and environmental microbiology*, 71 (3), 1453–1461.
160. Lodder, W.J., Schijven, J.F., Rutjesa, S.A., de Roda Husman, A.M., & Teunis, P.F.M. (2015). Enterovirus and parechovirus distributions in surface water and probabilities of exposure to these viruses during water recreation. *Water Research*, 75, 25–32.
161. Lodder, W.J., van den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A. & de Roda Husman, A.M. (2010). Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands. *Applied and environmental microbiology*, 76, 17, 5965–5971.
162. Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., & Le Guyader, F.S. (2005). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 123 (1), 1-7.
163. Lupulovic, D., Lazić, S., Prodanov-Radulović, J., Jiménez de Oya, N., Escribano-Romero, E., Saiz, J.C., & Petrovic, T. (2010). First serological study of Hepatitis E virus infection in backyard pigs from Serbia. *Food and Environmental Virology*, 2, 110–113.
164. Lupulovic, D., Petrovic, T., Lazić, S., Prodanov-Radulović, J., Došen, R., & Pušić, I. (2011). Seroprevalenca hepatitis e virusne infekcije kod divljih svinja u srbiji. *Arhiv veterinarske medicine*, 4 (1), 19-29.
165. Maalouf, H., Pommepuy, M. & Le Guyader, F.S. (2010). Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. *Food and Environmental Virology* 2 (3), 136–145.
166. Maclachlan, N.J. & Dubovi, E.J. (2011). Fenner’s veterinary Virology (Fourth Edition). Academic Press is an imprint of Elsevier 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK.
167. Maluquer de Motes, C., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martín, M., & Girones, R. (2004). Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Applied and environmental microbiology*, 70 (3), 1448–1454.



168. Mans, J., Murray, T.Y., Nadan, S., Netshikweta, R., Page, N.A., Taylor, M.B. (2016). Norovirus diversity in children with gastroenteritis in South Africa from 2009 to 2013: GII.4 variants and recombinant strains predominate. *Epidemiol Infect.*, 144, 907-916.
169. Mans, J., Netshikweta, R., Magwalivha, M., Van Zyl, W.B., & Taylor, M.B. (2013). Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. *Epidemiology and Infection*, 141 (02), 303-313.
170. Martínez-Martínez, M., Díez-Valcarce, M., Hernández, M., & Rodríguez-La´zaro, D. (2011). Design and Application of Nucleic Acid Standards for Quantitative Detection of Enteric Viruses by Real-time PCR. *Food Environ Virol.*, 3, 92–98.
171. Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., & Oppliger, A. (2013). High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water research*, 47, 5101-5109.
172. Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., Coillie, E.V., Uyttendaele, M., & Thiry, E. (2012). A Review of Known and Hypothetical Transmission Routes for Noroviruses. *Food and Environmental Virology*, 4, 131–152.
173. Maunula, L. (2007). Waterborne norovirus outbreaks. *Future Virol.*, 2 (1), 101–112.
174. Maunula, L., Kaupke, A., Vasickova, P., Söderberg, K., Kozyra, I., Lazić, S., van der Poel, W.H., Bouwknecht, M., Rutjes, S., Willems, K.A., Moloney, R., D'Agostino, M., de Roda Husman, A.M., von Bonsdorff, C.H., Rzeżutka, A., Pavlik, I., Petrovic, T., & Cook, N. (2013). Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int J Food Microbiol.*, 167 (2), 177-185.
175. Maunula, L., Klemola, P., Kauppinen, A., Söderberg, K., Nguyen, T., Pitkänen, T., Kaijalainen, S., Simonen, M.L., Miettinen, I.T., Lappalainen, M., Laine, J., Vuento, R., Kuusi, M., & Roivainen, M. (2009). Enteric Viruses in a Large Waterborne Outbreak of Acute Gastroenteritis in Finland. *Food Environ Virol*, 1, 31–36.
176. Maunula, L., Miettinen, I. T., & von Bonsdorff, C.-H. (2005). Norovirus Outbreaks from Drinking Water. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (11), 1716–1721.
177. Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 74 (2), 560–564.
178. Medic, S., Ilic, S., & Zobenica, R. (2015). Virusni hepatitis. In: *Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2014. godina* (Petrovic, V., ed.), Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, ISSN 1452-8916.
179. Medici, M.C., Martinelli, M., Ruggeri, F.M., Abelli, L.A., Bosco, S., Arcangeletti, M.C., Pinaridi, F., Conto, F.D., Calderaro, A., Chezzi, C., & Dettori, G. (2005). Broadly Reactive Nested Reverse Transcription-PCR Using an Internal RNA Standard Control for Detection of Noroviruses in Stool Samples. *Journal of clinical microbiology*, 43 (8), 3772-3778.
180. Medici, M.C., Tummolo, F., Martella, F., Chezzi, C., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., & Calderaro, A. (2014). Epidemiological and molecular features of norovirus infections in Italian children affected with acute gastroenteritis. *Epidemiol. Infect.*, 142, 2326–2335.
181. Melnick, J.L. (1984). Etiologic agents and their potential for causing waterborne virus diseases. Enteric viruses in water (Melnick, J.L. Ed.), Karger, Basel, Switzerland, 15, 1-16. <http://www.karger.com/Book/Home/220541>
182. Misković, M., Radulović, T., Ruzin, S., & Jasminka Gajer (2009). Park prirode Jegrička. Futura, Petrovaradin. ISBN 978-86-908041-6-0.
183. Mitsui, T., Tsukamoto, Y., Suzuki, S., Yamazaki, C., Masuko, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Tsatsralt-Od, B., Nishizawa, T., & Okamoto, H. (2005). Serological and molecular studies



- on subclinical hepatitis E virus infection using periodic serum samples obtained from healthy individuals. *J Med Virol.*, 76 (4), 526-533.
184. Mizuo, H., Suzuki, K., Takikawa, Y., Sugai, Y., Tokita, H., Akahane, Y., Itoh, K., Gotanda, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., & Okamoto, H. (2002). Polyphyletic strains of hepatitis E virus are responsible for sporadic cases of acute hepatitis in Japan. *J Clin Microbiol.*, 40 (9), 3209-3218.
185. Monini, M., Di Bartolo, I., Ianiro, G., Angeloni, G., Magistrali, C.F., Ostanello, F., Ruggeri, F.M. (2015). Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds. *Arch Virol.*, 160 (10), 2547-56.
186. Myrmel, M., Lange, H., & Rimstad, E. (2015). A 1-Year Quantitative Survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and Hepatitis E Viruses in Raw and Secondarily Treated Sewage from Two Plants in Norway. *Food and Environmental Virology*. Published online 24.05.2015. DOI 10.1007/s12560-015-9200-x.
187. Nagy, M., Nagy, E., & Tuboly, T. (2001). The complete nucleotide sequence of porcine adenovirus serotype 5. *J Gen Virol.*, 82 (Pt3), 525-9.
188. Nairn, C., Lovatt, A., Galbraith, D.N. (2003). Detection of infectious Bovine polyomavirus. *Biologicals*, 31, 303–306.
189. Nakano, T., Takahashi, K., Arai, M., Okano, H., Kato, H., Ayada, M., Okamoto, H., & Mishiro, S. (2013). Identification of European-type hepatitis E virus subtype 3e isolates in Japanese wild boars: molecular tracing of HEV from swine to wild boars. *Infect Genet Evol.*, 18, 287-298.
190. Nietfeld, J.C. & Leslie-Steen, P. (1993). Interstitial nephritis in pigs with adenovirus infection. *J Vet Diagn Invest*, 5, 269-273.
191. Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L., & Lindgren, P.E. (2008). Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res.*, 43 (4), 1117-25.
192. Novosel, D., Lipej, Z., Vojta, L. & Vojta, A. (2009). Direct Submission: Hepatitis E virus. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ591364>
193. Okoh, A.I., Sibanda, T., & Gusha, S.S. (2010). Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 2620-2637.
194. Osuolale, O., & Okoh, A. (2015). Incidence of human adenoviruses and Hepatitis A virus in the final effluent of selected wastewater treatment plants in Eastern Cape Province, South Africa. *Virology Journal*, 12, 98.
195. Pacesa, M., Greber, U.F., Podgorski, I., Harrach, B. & Hemmi, S. (2016). Direct Submission: Full genome sequence of HAdV-40 HoviX strain. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU162869>
196. Panà, A., Divizia, M., De Filippis, P. & Di Napoli, A. (1987). Isolation of hepatitis A virus from polluted river water on FRP/3 cells. *Lancet*, 330 (8571), 1328.
197. Papapetropoulou, M. & Vantarakis, A.C. (1998). Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *The Journal of Infection*, 36 (1), 101–103.
198. Parasidis, T.A., Konstantinidis, T.G., & Alexandropoulou, I.G. (2013a). Environmental Monitoring of Enteric Viruses in Wastewater. *Virology & Mycology*, 2, 1.
199. Parasidis, T.A., Alexandropoulou, I.G., Konstantinidis, T.G., Panopoulou, M., & Constantinidis, T.C. (2013b). Epidemiological surveillance of enteric viruses in East Macedonia and Thrace region in Greece. *Journal of Applied Virology*, 2 (4), 2306-6210.



200. Parry, J.V. & Gardner, S.D. (1986). Human exposure to bovine polyomavirus: A zoonosis? *Archives of Virology*, 87 (3), 287-296.
201. Pauly, M., Akoua-Koffi, C., Buchwald, N., Schubert, G., Weiss, S., Couacy-Hymann, E., Anoh, A.E., Mossoun, A., Calvignac-Spencer, S., Leendertz, S.A., Leendertz, F.H., & Ehlers, B. (2015). Adenovirus in Rural Côte D'Ivoire: High Diversity and Cross-Species Detection. *Ecohealth.*, 12 (3), 441-452.
202. Pavoni, E., Barbieri, I., Colombrita, D., Di Bartolo, I., Ruggeri, F.M., Caruso, A. & Losio, M.N. (2014). Detection of a nosocomial outbreak caused by a GII.4-2006b Norovirus variant during a diagnostic study of paediatric gastroenteritis in the main hospital of Brescia, Italy, 2007 - 2009. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ598057>
203. Pejcic, S. (2012). Postrojenje za tretman otpadnih voda grada Subotice. Prezentacija primera dobre prakse – projekata podržanih od strane EU. 05.jun. <http://www.vodovodsu.rs/4-Publikacije/250-PREZENTACIJA-UPOV-SUBOTICA>
204. Pencev, P.G. & Pinka, P.G. (2015). Danube River. Encyclopaedia britannica, Last Updated: 12-9-2015. <https://www.britannica.com/place/Danube-River>
205. Peretti, A., FitzGerald, P.C., Bliskovsky, V., Buck, C.B., Pastrana, D.V. (2015). Hamburger polyomaviruses. *J Gen Virol.* 96 (Pt 4), 833-9.
206. Petrovic, T. (2013). Prevalence of viruses in food and the environment. In: *Viruses in food and water. Risks, surveillance and control* (N. Cook, Ed.), pp. 19-46. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
207. Petrovic, T., Lazić, S., Kapetanov, M., & Velhner, M. (2006). Molekularna dijagnostika virusa avijarne influence. *Vet. glasnik*, 60 (5-6) 385 - 396.
208. Petrovic, T., Lupulovic, D., Jiménez de Oya, N., Vojvodić, S., Blázquez, A.B., Escribano-Romero, E., Martín-Acebes, M.A., Potkonjak, A., Milošević, V., Lazić, S., & Saiz, J.C. (2014a). Prevalence of hepatitis E virus (HEV) antibodies in Serbian blood donors. *J Infect Dev Ctries*, 8 (10), 1322-1327.
209. Petrovic, T., Lupulovic, D., Lazić, G., Lazić, S., & Saiz, H.J. (2014b). HEV in Serbia: results of recent studies. *4th International Conference on Food and Environmental Virology*, 2 – 5 September 2014, Corfu, Greece, pp 45-47.
210. Petrovic, T., Lupulović, D., Vidanović, D., & Lazić, S. (2010a). Detection and characterisation of hepatitis E virus in big industrial pig farms in Serbia, Symposium „Future Chalanges in Food and Environmental Virology, 7 - 9 October 2010, Istanbul, Turska, Proceedings, str 43.
211. Petrovic, T., Prodanov, J., Lazić, S. (2008). First preliminary results on the presence of Hepatitis E virus in swine population in Serbia. *Symposium on Current Developments in Food and Environmental Virology*, Pisa, Italy, pp. 52–53.
212. Petrovic, T., Velhner, M., Petrovic, J., Stojanov, I., Grgić, Ž., & Lazić, S. (2010b). Savremene metode laboratorijske dijagnostike u veterinarskoj medicini i mogućnosti njihove primene. *Arhiv veterinarske medicine*, 3 (1), 39-61.
213. Pina, S., Buti, M., Cotrina, M., Piella, J., & Girones, R., (2000). HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *Journal of Hepatology*, 33 (5), 826-833.
214. Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998). Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9), 3376–3382.
215. Pinto, R.M., Alegre, D., Domínguez, A., El-Senousy, W.M., Sánchez, G., Villena, C., Costafreda, M.I., Aragonè, S. L., & Bosch, A. (2007). *Epidemiol Infect.*, 135 (2), 270-273.



216. Pinto, R.M., Costafreda, M.I., Perez-Rodriguez, F.J., D'Andrea, L., & Bosch, A. (2010). Hepatitis A Virus: State of the Art. *Food and Environmental Virology*, 2, 127–135.
217. Podewils, L.J., Zanardi Blevins, L., Hagenbuch, M., Itani, D., Burns, A., Otto, C., Blanton, L., Adams, S., Monroe, S.S., Beach, M.J., & Widdowson, M. (2007). Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect.*, 135 (5), 827-33.
218. Pond, K. (2005). Water Recreation and Disease. Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality. pp. 1-231. World Health Organization, IWA Publishing, UK.
219. Portes, S.A.R., Volotao, E.M., Rose, T.L., Andrade, J.S.R., Assis, R.M.S., Xavier, Md.P.T.P., Ferreira, M.S., Miagostovich, M.P., Leite, J.P.G. & Costa-Carvalho, F.A. (2015). Direct Submission: Investigation of an outbreak of acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/786316563/>
220. Prpic, J., Černi, S., Škorić, D., Keros, T., Brnić, D., Cvetnić, Ž., & Jemeršić, L. (2015). Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food and Environmental Virology*, 7 (3), 195-205.
221. Pusch D., Oh, D.Y., Wolf, S., Dumke, R., Schroter-Bobsin, U., Hohne, M., Roske, I., & Schreier, E. (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* 150, 929–947.
222. Quidort, W.L. (2013). Detection and infectivity of human adenovirus in wastewater effluent, biosolids, and shellfish, and its persistence in estuarine water. Dissertation. The Faculty of the School of Marine Science the College of William and Mary, Virginia.
223. Rab, M.A., Bile, M.K, Mubarik, M.M., Asghar, H., Sami, Z., Siddiqi, S., Dil, A.S., Barzgar, M.A., Chaudhry, M.A., & Burney, M.I. (1997). Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: a common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57 (2), 151-157.
224. Rajcevic, S., Ilić, S., & Zobenica, R. (2014). Virusni hepatitisi. In: *Zarazne bolesti u AP Vojvodini 2013. godina* (Petrovic, V., ed.), Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, ISSN 1452-8916.
225. Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L., & Murakami, W.T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*. 295 (5845), 110-5.
226. Reddy, P.S., Idamakanti, N., Babiuk, L.A., Mehtali, M., & Tikoo, S.K. (1999a). Porcine adenovirus-3 as a helper-dependent expression vector. *Journal of General Virology*, 80, 2909–2916.
227. Reddy, P.S., Idamakanti, N., Derbyshire, J.B., & Nagy, E. (1996). Porcine adenoviruses types 1, 2 and 3 have short and simple early E-3 regions. *Virus Res.*, 43 (2), 99-109.
228. Reddy, P.S., Idamakanti, N., Hyun, B.-H., Tikoo, S.K., & Babiuk, L.A. (1999b). Development of porcine adenovirus-3 as an expression vector. *Journal of General Virology*, 80, 563–570.
229. Reddy, P.S., Tuboly, T., Nagy, E., & Derbyshire, J.B. (1995). Molecular cloning and physical mapping of porcine adenovirus types 1 and 2. *Arch Virol.*, 140 (1), 195-200.
230. Relic, T., Begović-Lazarević, I., Pavlović, N., Ilić, N., Kacarević, H., Jovanović, D., Kostić, G., & Lazarević, I. (2015). Characteristics of norovirus infection in Serbia. *Vojnosanit Pregl.*, 72 (4), 328-33.
231. Reuter, G., Fodor, D., Forgách, P., Kátai, A., & Szucs, G. (2009). Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *Journal of Clinical Virology*, 44 (4), 277-281.



232. Riezebos-Brilman, A., Verschuuren, E.A., van Son, W.J., van Imhoff, G.W., Brügemann, J., Blokzijl, H., Niesters, H.G. (2013). The clinical course of hepatitis E virus infection in patients of a tertiary Dutch hospital over a 5-year period. *J Clin Virol.*, 58 (3), 509-514.
233. Ristic, M., Seguljev, Z., Petrovic, V., & Ilic, S. (2011). Epidemiološke karakteristike hepatitisa A u Vojvodini u periodu od 1988. do 2009. godine. *Med. Pregl.*, LXIV (11-12), 570-574.
234. Robertson, W., & Yasvinski, G. (2012). Exposure. In: *Animal Waste, Water Quality and Human Health*, (Al Dufour, Jamie Bartram, Robert Bos and Victor Gannon Ed.), pp. 257-281. World Health Organization, IWA Publishing, UK.
235. Robinson, C.M., Singh, G., Lee, J.Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E.B., Yousuf, M.A., Betensky, R.A., Jones, M.S., Dyer, D.W., Seto, D., & Chodosh, J. (2013). Molecular evolution of human adenoviruses. *Scientific reports*, 3, 1812.
236. Rodriguez-Lazaro, D., Cook, N., Ruggeri, F.M., Sellwood, J., Nasser, A., Sao Jose Nascimento, M., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J.C., Rzezutka, A., Bosch, A., Girones, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovac, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., Bonsdorff, C.-H., de Roda Husman, A.M., Hernandez, M., & van der Poel, W.H.M. (2012). Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 1–29.
237. Rodriguez-Lazaro, D., Hernández, M., D'agostino, M., & Cook, N. (2006). Application of nucleic acid sequence-based Amplification for the detection of viable Foodborne pathogens: progress and challenges. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 14, 218–236.
238. Rodriguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., Jardi, R., & Girones, R. (2010). Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples. *Journal of Water and Health*, 08.2, 346-354.
239. Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., & Ward, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 84, 570-3.
240. Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hundesa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., Ziros, P., Kay, D., Miagostovich, M., Vargha, M., Allard, A., Vantarakis, A., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., & Girones, R. (2014). Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Research*, 59, 119–129.
241. Russell, W.C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *Journal of General Virology*, 90, 1–20.
242. Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Bouwknecht, M., & de Roda Husman, A.M. (2007). Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 143 (1), 112–116.
243. Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Lodder-Verschuur, F., van den Berg, H.H.J.L., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M., & de Roda Husman, A.M. (2009). Sources of Hepatitis E Virus Genotype 3 in the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (3), 381-387.
244. Rutjes, S.A., van den Berg, H.H., Lodder, W.J., & de Roda Husman, A.M. (2006). Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. *Appl Environ Microbiol.*, 72 (8), 5349-58.
245. Saban, S.D., Silvestry, M., Nemerow, G.R. & Stewart, P.L. (2006). Visualization of a-helices in a 6-Å resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. *J. Virol.*, 80, 12049–12059.



246. Said, R., Wolfaardt, M., & Taylor, M.B. (2014). Molecular characterisation of hepatitis A virus strains from water sources in South Africa. *Water Sci Technol.*, 69 (5), 923-33.
247. Saif, L.J. & Thiel, K. (1989). *Viral Diarrheas of Man and Animals*. CRC Press.
248. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., & Erlich, H.A. (1988). Primer - directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
249. Saiki, R.K., Scharf, S., & Faloona, F. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
250. San Martin, C. (2012). Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses*, 4, 847-877.
251. Sanford, S.E. & Hoover, D.M. (1983). Enteric Adenovirus Infection in Pigs. *Can. J. Comp. Med.*, 47, 396-400.
252. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 74 (12), 5463-5467.
253. Santos, R., & Monteiro, S. (2013). Epidemiology, control, and prevention of emerging zoonotic viruses. In: *Viruses in food and water. Risks, surveillance and control* (N. Cook, Ed.), pp. 442-457. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
254. Sato, H., Yokoyama, M. & Motomura, K. (2016). Evidence for antigenic variation in norovirus outbreaks in Japan between 2006 and 2012. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB972473>
255. Sato, Y., Sato, H., Naka, K., Furuya, S., Tsukiji, H., Kitagawa, K., Sonoda, Y., Usui, T., Sakamoto, H., Yoshino, S., Shimizu, Y., Takahashi, M., Nagashima, S., Jirintai, Nishizawa, T., Okamoto, H. (2011). A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch Virol.*, 156 (8), 1345-1358.
256. Schiff, E.R. (1992). Atypical clinical manifestations of hepatitis A. *Vaccine*, 10(1), 18-20.
257. Schuster, S.C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods*, 5 (1), 16-18.
258. Schuurman, R., Jacobs, M., van Strien, A., van der Noordaa, J., & Sol, C. (1992). Analysis of splice sites in the early region of bovine polyomavirus: evidence for a unique pattern of large T mRNA splicing. *J Gen Virol.*, 73 (Pt 11), 2879-2886.
259. Schuurman, R., Sol, C., & van der Noordaa, J. (1990). The complete nucleotide sequence of bovine polyomavirus. *J Gen Virol.* 71 (Pt 8), 1723-1735.
260. Schuurman, R., van Steenis, B., van Strien, A., van der Noordaa, J., & Sol, C. (1991). Frequent detection of bovine polyomavirus in commercial batches of calf serum by using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 72, 2739-2745.
261. Schvoerer, E., Bonnet, F., Dubois, V., Cazaux, G., Serceau, R., Fleury, H. & Lafon, M.E. (2000). PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in south-western France. *Research in Microbiology*, 151, 693-701.
262. Sedmak, G., Bina, D., & MacDonald, J. (2003). Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7181-7187.



263. Severi, E., Verhoef, L., Thornton, L., Guzman-Herrador, B.R., Faber, M., Sundqvist, L., Rimhanen-Finne, R., Roque-Afonso, A.M., Ngui, S.L., Allerberger, F., Baumann-Popczyk, A., Muller, L., Parmakova, K., Alfonsi, V., Tivoschi, L., Vennema, H., Fitzgerald, M., Myrmel, M., Gertler, M., Ederth, J., Kontio, M., Vanbockstael, C., Mandal, S., Sadkowska-Todys, M., Tosti, M.E., Schimmer, B., O’Gorman, J., Stene-Johansen, K., Wenzel, J.J., Jones, G., Balogun, K., Ciccaglione, A.R., O’Connor, L., Vold, L., Takkinen, J., & Rizzo, C. (2015). Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Eurosurveillance*, 20 (29).
264. Shaddock, J.A., Koestnearn, A., & Kasza, L. (1967). The Lesions of Porcine Adenoviral Infection in Germfree and Pathogen-Free Pigs. *Path. vet.*, 4, 537-552.
265. Silva, H.D., Garcia-Zapata, M.T.A., & Anunciacao, C.E. (2011). Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker? *Food and Environmental Virology*, 3, 138–140.
266. Silva, H.D., Wosnjuk, L.A.C., Santos, S.F.O., Vilanova-Costa, C.A.S.T., Pereira, F.C., Silveira-Lacerda, E.P., Garciazapata, M.T.A. & Anunciacao, C.E. (2010). Molecular detection of Adenoviruses in Lakes and Rivers of Goiania, Goias, Brazil. *Food and Environmental Virology*, 2, 35–40.
267. Sinclair, R.G., Jones, E.L. & Gerba, C.P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review, *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1769–1780.
268. Sisay, Z.W., Saif, L.J., Berhe, N., Blanco, S., Nijahira, M., Wang, Q. & Djikeng, A. (2014). Molecular Epidemiology of Enteric Viruses in Ethiopia. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KM589659>
269. Skraber, S., Italiaander, R., Lodder, W.J., & de Roda Husman, A.M. (2005). Noroviruses in Archival Samples. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (3), 489-491.
270. Sobsey, M.D. & Glass, J.S. (1984). Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47 (5), 956-960.
271. Sobsey, M.D. & Jones, B.L. (1979). Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl Environ Microbiol.*, 37 (3), 588–595.
272. Sobsey, M.D. & Meschke, J.S. (2003). Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. Draft, august 21.
273. Sobsey, M.D., Wallis, C., Henderson, M., & Melnick, J.L. (1973). Concentration of enteroviruses from large volumes of water. *Appl. Microbiol.*, 26, 529-534.
274. Song, Y.J., Jeong, H.J., Kim, Y.J., Lee, S.W., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Park, H.M., & Choi, I.S. (2010). Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J Med Virol.*, 82 (4), 583-591.
275. Srinivasan, S., & Batra, J. (2014). Four Generations of Sequencing- Is it ready for the Clinic Yet?. *Next Generat Sequenc & Applic*, 1, 1000107.
276. Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., Heck, T.M.S., Spilki, F.R., & Almeida, S.E.M. (2015). Quantitative vs. Conventional pcr for detection of human adenoviruses in water and sediment samples *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 57 (4), 299-303.
277. Stals, A., Mathijs, E., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., Coillie, E.V., Thiry, E., & Uyttendaele, M. (2012). Molecular Detection and Genotyping of Noroviruses. *Food and Environmental Virology*, 4, 153–167.



278. Steyer, A., Naglič, T., Moc̃ilnik, T., Poljšak-Prijatelj, M., & Poljak, M. (2011). Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: Prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1732–1737.
279. Stjepanovic, A., Marković, B., & Vesković-Moračanin, S. (2007). Molekularno-biološke metode u mikrobiološkoj kontroli mesa i proizvoda od mesa. *Tehnologija mesa*, 48 (1-2), 123-130.
280. Swine Health Information Center and Center for Food Security and Public Health (SHC & CFSPH) (2015). Porcine adenovirus. Iowa State University. <http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-porcine-adenovirus>
281. Tabain, I. (2011). Virološke, kliničke i epidemiološke osobitosti adenovirusnih dišnih infekcija u djece u Zagrebu i okolici. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb.
282. Takahashi, K., Abe, N. & Mishiro, S. (2009). Nearly complete nucleotide sequence of hepatitis E virus isolate recovered from a Japanese patient. Published Only in Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB291963>
283. Tamura K., Nei M., & Kumar S.(2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101, 11030-11035.
284. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
285. Taylor, M.B. (2011). Water- and foodborne viruses: current developments. *Continuing Medical Education*, 29 (5), 207-209.
286. Teixeira, D.M., Hernandez, J.M., Silva, L.D., Oliveira, D.S., Spada, P.K., Gurjão, T.C., Mascarenhas, J.D., Linhares, A.C., Morais, L.L., & Gabbay. Y.B. (2015). Occurrence of Norovirus GIV in Environmental Water Samples from Belém City, Amazon Region, Brazil. *Food Environ Virol.*, Nov 4. [Epub ahead of print].
287. Terzic, D., Dupanovic. B., Mugosa, B., Drašković, N., & Svirtlih, N. (2009). Acute hepatitis E in Montenegro: epidemiology, clinical and laboratory features. *Ann Hepatol.*, 8 (3), 203-206.
288. Teunis, P.F., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., & Calderon, R.L. (2008). Norwalk virus: how infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80, 1468–1476.
289. Tian ,H,, Fu, X,, Li, W., Huang, Y., Sun, J., Zhou, G., Zhou, C., Shen, Q., Yang, S., & Zhang, W. (2015). Genotype 4 Hepatitis E Virus Prevalent in Eastern China Shows Diverse Subtypes. *Hepat Mon.*, 15 (6), e25367.
290. Toogood, C.I., Crompton, J., & Hay, R.T. (1992). Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *J Gen Virol.*, 73 (6), 1429-1435.
291. Toogood, C.I., & Hay, R.T. (1988). DNA sequence of the adenovirus type 41 hexon gene and predicted structure of the protein. *J Gen Virol.*, 69 (Pt 9), 2291-2301.
292. Toogood, C.I., Murali, R., Burnett, R.M., & Hay, R.T. (1989). The adenovirus type 40 hexon: sequence, predicted structure and relationship to other adenovirus hexons. *J Gen Virol.*, 70 (Pt 12), 3203-3214.
293. Tuboly, T. & Nagy, E. (2001). Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. *Journal of General Virology*, 82, 183–190.



294. Van Borm, S., Rosseel, T., Behaeghel, I., Saulmont, M., Delooz, L., Petitjean, T., Mathijs, E., Vandebussche, F. (2016). Complete Genome Sequence of Bovine Polyomavirus Type 1 from Aborted Cattle, Isolated in Belgium in 2014. *Genome Announc.*, 3, 4 (2).
295. van den Berg, H., Lodder, W., van der Poel, W., Vennema, H., & de Roda Husman, A.M. (2005). Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology*, 156, 532–540.
296. van der Poel, W.H.M. (2014). Food and environmental routes of hepatitis E virus transmission. *Curr Opin Virol*, 4, 91–96.
297. van der Poel, W.H., Verschoor, F., van der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Kooreman, M., & de Roda Husman, A.M. (2001). Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.*, 7 (6), 970-976.
298. van Heerden, J., Ehlers, M.M. & Grabow, W.O.K., (2005). Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1256-1264.
299. Vantarakis, A., Nearxou, A., Pagonidis, D., Melegos, F., Seretidis, J., Kokkinos, P., Zarkadis, I., Parasidis, T., & Alamanos, Y. (2010). An outbreak of hepatitis A in Roma populations living in three prefectures in Greece. *Epidemiology and Infection*, 138, 1025-1031.
300. Vasickova, P., Pavlik, I., Verani, M., & Carducci, A. (2010). Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces. *Food and Environmental Virology*, 2, 24–34.
301. Vaughan, G., Rossi, L.M.G., Forbi, J.C., de Paula, V.S., Purdy, M.A., Xia, G., & Khudyakov, Y.E. (2014). Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 227–243.
302. Venter, J.M.E., van Heerden, J., Vivier, J.C., Grabow, W.O.K. & Taylor, M.B. (2007). Hepatitis A virus in surface water in South Africa: what are the risks? *Journal of Water and Health*, 5 (2), 229-240.
303. Viancelli, A., Garcia, L.A.T., Kunz, A., Steinmetz, R., Esteves, P.A., & Barardi, C.R.M. (2012). Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. *Research in Veterinary Science*, 93, 538–543.
304. Victoria, M., Tort, .LF., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Cristina, J., & Colina, R. (2014). Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol.*, 6 (2), 116-124.
305. Vilagines, P., Sarrette, B., Husson, G., & Vilagines R. (1993). Glass Wool for Virus Concentration at Ambient Water pH Level. *Water Science & Technology*, 27 (3-4), 299–306.
306. Vinje, J. (2015). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 53 (2), 373-381.
307. Vivek, R., Zachariah, U.G., Ramachandran, J., Eapen, C.E., Rajan, D.P., & Kang, G. (2013). Characterization of hepatitis E virus from sporadic hepatitis cases and sewage samples from Vellore, south India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 107, 363–367.
308. Wallis, C. & Melnick, J.L. (1967). Concentration of viruses on aluminum and calcium salts. *Am. J. Epidemiol.*, 85, 459-468.
309. Wang, J., Horner, G.W., & O'Keefe, J.S. (2005). Detection and molecular characterisation of bovine polyomavirus in bovine sera in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 53 (1), 26-30.
310. Wei, J., Jan, Y., Sims, T., & Kniel, K.E. (2009). Survival of human adenovirus 41 in land-applied manure and biosolids. . *Food and Environmental Virology*, 1, 148-154.



311. Wenzel, J.J., Preiss, J., Schemmerer, M., Huber, B., Plentz, A., & Jilg, W. (2011). Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol.*, 52 (1), 50-54.
312. Whitton, J.L., Cornell, C.T., & Feuer, R. (2005). Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 765-776.
313. WHO World Health Organization 2015. Hepatitis E, Fact sheet N°280, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>
314. WHO World Health Organization 2014. Waterborne outbreaks of hepatitis E: Recognition, investigation and control. *Technical report*. Printed in Geneva, Switzerland.
315. Wiczorek, M., Krzysztozek, A., & Witek, A. (2015). Species-Specific Identification of Human Adenoviruses in Sewage. *Polish Journal of Microbiology*, 64 (1), 23–28.
316. Wong, K. & Xagorarakis, I. (2011). Evaluating the prevalence and genetic diversity of adenovirus and polyomavirus in bovine waste for microbial source tracking. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 1521–1526.
317. Wyn-Jones, A., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Höller, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., López-Pila, J., Muscillo, M., São José Nascimento, M., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., & Wyer, M. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*, 45 (3), 1025 - 1038.
318. Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., Tanaka, T., & Okamoto, H. (2009). ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol.*, 90 (Pt8), 1880-1891.
319. Yezli, S. & Otter, J.A. (2011). Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. *Food and Environmental Virology*, 3, 1–30.
320. Yugo, D.M. & Meng, X.J. (2013). Hepatitis E Virus: Foodborne, Waterborne and Zoonotic Transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 4507-4533.
321. Zhou, N., Zhang, H., Lin, X., Hou, P., Wang, S., Tao, Z., Bi, Z., & Xu, A. (2015). A waterborne norovirus gastroenteritis outbreak in a school, eastern China. *Epidemiol Infect.*, 20, 1-8.
322. Ziros, P.G., Kokkinos, P.A., Allard, A., & Vantarakis, A. (2015). Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Adenovirus 40 and 41. *Food and Environmental Virology*, 7 (3), 276-285.
323. Zuckerman, A.J. (1996). Hepatitis Viruses. In: *Medical Microbiology*. 4th edition. (Baron S., Ed.), Chapter 70. University of Texas Medical Branch at Galveston.
324. Zwettler, D., Revilla-Fernandez, S., Steinrigl, A. & Winter, P. (2010). Direct Submission: Development of a real-time RT-PCR method for the detection of HEV in Austrian swine. Unpublished. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM623775>



9 PRILOG



Tabela 15. Sekvence deponovane u GenBank

GenBank Accession no. KX570630

Human adenovirus 40 isolate HAdV40/sw/SRB/8745-5-2013 hexon gene, partial cds.

gccgggcaggacgcctcggagtacctgagcccgggctggtgcagttgccctgccaccgatacctacttcagcctggggaacaagttcaga
aaccaccctggctcccacccacgatgtaaccacagacaggtcgagcgactgacgctgcgcttcgtgccctcgaccgcgaggaaaccgc
ctactcttaaaagtgcgctttacgctggccgtgggcgacaaccgggtttggacatggccagcacctac

GenBank Accession no. KX570631

Human adenovirus 40 isolate HAdV40/wt/SRB/8454-1-2013 hexon gene, partial cds.

gccgggcaggacgcctcggagtacctgagcccgggctggtgcagttgccctgccaccgatacctacttcagcctggggaacaagttcaga
aaccaccctggctcccacccacgatgtaaccacagacaggtcgagcgactgacgctgcgcttcgtgccctcgaccgcgaggaaaccgc
ctactcttaaaagtgcgctttacgctggccgtgggcgacaaccgggtttggacatggccagcacctac

GenBank Accession no. KX570632

Human adenovirus 40 isolate HAdV40/wt/SRB/2401-3-2014 hexon gene, partial cds.

gccgggcaggacgcctcggagtacctgagcccgggctggtgcagttgccctgccaccgatacctacttcagcctggggaacaagttcaga
aaccaccctggctcccacccacgatgtaaccacagacaggtcgagcgactgacgctgcgcttcgtgccctcgaccgcgaggaaaccgc
ctactcttaaaagtgcgctttacgctggccgtgggcgacaaccgggtttggacatggccagcacctac

GenBank Accession no. KX570633

Human adenovirus 41 isolate HAdV41/wt/SRB/3029-1-2014 hexon gene, partial cds.

gccgggcaggacgcctcggagtatctgagtcgggctggtgcagttgccctgccaccgatacgtacttcagcctggggaacaagttcaga
aaccaccctggtgctccgaccacgatgtaaccacagacaggtcacagcgactgacgctgcgattcgtgccagtcgaccgcgaggacaccgct
tattcttaaaagtgcgctttacgctggccgtgggcgacaaccgggtgttgacatggccagcacctac

GenBank Accession no. KX570634

Human adenovirus 41 isolate HAdV41/sw/SRB/8454-3-2013 hexon gene, partial cds.

gccgggcaggacgcctcggagtatctgagtcgggctggtgcagttgccctgccaccgatacgtacttcagcctggggaacaagttcaga
aaccaccctggtgctccgaccacgatgtaaccacagacaggtcacagcgactgacgctgcgattcgtgccagtcgaccgcgaggacaccgct
tattcttaaaagtgcgctttacgctggccgtgggcgacaaccgggtgttgacatggccagcacctac

GenBank Accession no. KX570635

Human adenovirus 41 isolate HAdV41/wt/SRB/6096-1-2014 hexon gene, partial cds.

gccgggcaggacgcctcggagtatctgagtcgggctggtgcagttgccctgccaccgatacgtacttcagcctggggaacaagttcaga
aaccaccctggtgctccgaccacgatgtaaccacagacaggtcacagcgactgacgctgcgattcgtgccagtcgaccgcgaggacaccgct
tattcttaaaagtgcgctttacgctggccgtgggcgacaaccgggtgttgacatggccagcacctac

GenBank Accession no. KX570636

Norovirus GI isolate NoVGI/sw/SRB/2621-7-2014 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, partial cds.

aatagacaaatcatgacagagtcattctcaatcatgtgtcggctaactgcatcacctgaactagcttcagtggtggctcaagatttgcttcacc
ctcagagatggatgtggcactatgtcataagagtgaaggaaggcctccatctggttttccatgtacatcacaggttaatagtataaaccatt
ggtaataaactctgtgtgcctttctgaagtaactggcctgtgccagatgtcatccagtcctatgtcatatt



GenBank Accession no. KX570637

Norovirus GII isolate NoVGII/wt/SRB/9995-3-2013 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, partial cds.

caaagggatgtgctagcagcagcactagaaatcatggttaagttctccagaaccacacctagcccaggtagttgcagaagacctcctttccc
ctagcgtaatggatgtaggtgactttcaaatatcaataagtgagggtcttccctctggggccttgctacccagtggaattccatcgcccat
ggctcctcactctttgtgactctctgaagtcacggacctgcccctgacatcattcaggccaactccctttt

GenBank Accession no. KX570638

Porcine adenovirus 5 isolate PAdV5/wt/SRB/6096-3-2014 hexon gene, partial cds.

cacatccaggttctcagaaatTTTTGCCATCAGAAACCTTTACTTCTCCGGGGACATACACCTACGAGTGGTCTTTTCGTAAGATGTCAAC
ATGGTCTTCAGAGCACCTGGGGAACGATCTCAGGGTCGACGGCGCTCCATCAGAAATAGACAGCGTGAACCTGTACGCCAGCTTCTCCCAT
GGCCACAACACGGCTCTACTCTGGAGGCATGTTGAGAAACGACACCAACGATCAGTCTTTATTGATTACTGTCTGTCAGCGAACATGTGT
ACCCATCCCCGCCGGGCTTCT

GenBank Accession no. KX570639

Bovine polyomavirus isolate BPyV/wt/SRB/8424-2-2013 VP1 gene, partial cds.

tagtccctccaaactcagcaacaaatcccaggtgctagatcccaccctcaagggaaactagacaaagatgggtgtgatcctgttgaatgttg
gtgtccagatccaagtaaaaatgaaaacaccaggtacttcggaacatatacaggtgggttagcactccgcctgtgctgcagttcacaataact
tgacaaccattctt

GenBank Accession no. KX570640

Hepatitis E virus isolate HEV/wt/SRB/8921-3-2013 ORF1 gene, partial cds.

tggttcggcctttttatctcgtgtacaaaccgagattcttattaattgatgcaaccccgcaattggttttccgcctgaggtgctttggaatcat
cctatccagcgggtatacataatgagttagaacagattgccgggcccgggctggctcgtgttagaggtcggagctcatccgagatccattaa
tgataacccaacgttttacaccggtttccttagacctgttgccga

GenBank Accession no. KX570641

Hepatitis E virus isolate HEV/wt/SRB/10525-1-2012 ORF2 gene, partial cds.

tgacacaggctcccgttaattcttactaatacaccctatactggctgactggggctccttgattttgcgttagagctgaatttagaaatctg
acaccgggaacactaacaccctgtttccgggtataccagcacagctgccaccgactgcgccggtgctgatgggaccgctgagcttacc
ccacagcagccacacgtttcatgaaggatttgatttactggcacgaacggcgttggtgaggtggccgtggtattgctctgacactgttcaat
cttgctgatacgctt



Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: „Praćenje zdravstvenog stanja divljači i uvođenje novih biotehnoloških postupaka u detekciji zaraznih i zoonotskih agenasa - analiza rizika za zdravlje ljudi, domaćih i divljih životinja i kontaminaciju životne sredine“.
Projekat br: TR31084 (2010-2016), Koordinator dr Tamaš Petrović.
Mesto eksperimentalnog istraživanja je bila laboratorija odeljenja za virusologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:
RBR
Identifikacioni broj:
IBR
Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD
Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): Doktorska disertacija
VR
Ime i prezime autora: Gospava Lazić
AU
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): Dr Petar Knežević, vanredni profesor, mikrobiologija
MN 01.07. 2015.
Dr Tamaš Petrović, naučni savetnik, mikrobiologija i
zarazne bolesti, 26.04.2016.
Naslov rada: „Prisustvo i raširenost virusa životinja i ljudi u
NR površinskim vodama Vojvodine“
Jezik publikacije: Srpski jezik
JP
Jezik izvoda: srp. / eng.
JI
Zemlja publikovanja: Srbija
ZP
Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP
Godina: 2016
GO
Izdavač: Autorski reprint
IZ
Mesto i adresa: Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg
MA Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada: broj poglavlja 9/ stranica 209/ slika 74/ tabela 15/
FO referenci 324
Naučna oblast: Biologija
NO
Naučna disciplina: Mikrobiologija, Virusologija
ND
Predmetna odrednica, ključne reči: površinske vode, kanalizacione vode, adenovirusi ljudi
PO i svinja, norovirusi, hepatitis A i E virus, polyomavirus
goveda, real-time (RT)-PCR, molekularna tipizacija,

Srbija

UDK

Čuva se:

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ

Biblioteka Departmana za biologiju, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu i biblioteka Univerziteta u Novom Sadu

Nema

Više od 100 vrsta virusa ljudi i životinja se izlučuje u spoljašnju sredinu. Prisustvo ovih virusa u površinskim vodama reflektuje fekalnu kontaminaciju i ukazuje na opasnost za zdravlje ljudi i životinja. Na području Srbije se ne prati prisustvo patogenih virusa u površinskim vodama, pa čak ni u vodama za piće, a nije uspostavljena ni metodologija ovih ispitivanja. Shodno tome, cilj disertacije je da se utvrdi i analizira prisustvo animalnih i humanih virusa u površinskim vodama primenom najsavremenijih metoda koncentrovanja i detekcije virusa. U okviru disertacije ispitano je prisustvo sledećih virusa u površinskim vodama na teritoriji Vojvodine: humanih adenovirusa (HAdV); norovirusa (NoV) i hepatitis A virusa (HAV), adenovirusa svinja (PAdV), poliomavirusa goveda (BPyV) i hepatitis E virus (HEV).

Ispitano je ukupno 108 uzoraka površinskih i otpadnih voda koji su prikupljeni od oktobra 2012. godine do juna 2014. godine. U radu su primenjene najsavremenije metode koncentrovanja i detekcije virusa u vodi, koje se u Srbiji nisu koristile za ovu namenu. Sprovedenim ispitivanjima dokazano je da su animalni i humani virusi prisutni u površinskim vodama na području Vojvodine. Najčešće detektovan virus u površinskim vodama je humani adenovirus (42,4%), a potom norovirusi GII i GI (40,4% i 15,2%), adenovirus svinja (11,1%), poliomavirus goveda (7,1%) i hepatitis E virus (3,0%). U ukupno 9 testiranih uzoraka gradske kanalizacione vode najčešće je detektovan HAdV (44,4%), NoV GII i GI (66,7% i 22,2%), BPyV je detektovan u samo jednom od 9 uzoraka, a niti u jednom nisu detektovani PAdV i HEV. Hepatitis A virus nije detektovan u uzorcima, a eksperimentalno je potvrđeno da su metode primenljive i za detekciju ovog virusa. Na osnovu rezultata prinosa procesne kontrole i utvrđenog prisustva virusa u uzorcima, zaključeno je da se ove metode mogu veoma uspešno koristiti za detekciju virusne kontaminacije površinskih voda. Izvršena je i

genotipizacija virusa iz odabranih uzoraka metodom sekvenciranja dela virusnog genoma. Indirektno je potvrđeno da su infekcije detektovanim virusima prisutne u populaciji životinja i ljudi. Prisustvo virusa u površinskim vodama i uzorcima gradske kanalizacije odražava infektivni status stanovništva, ali predstavlja i značajan rizik za zdravlje životinja i ljudi na području koje gravitira ispitanim vodama.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: 31.03.2014.

DP

DO

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

KO

predsednik: dr Vesna Milošević, redovni profesor, Mikrobiologija sa parazitologijom i imunologijom, Medicinski fakultet Novi Sad; Institut za javno zdravlje Vojvodine

mentor: dr Petar Knežević, vanredni profesor, Mikrobiologija, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju u Novom Sadu

mentor: dr Tamaš Petrović, naučni savetnik, Mikrobiologija i zarazne bolesti, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad” u Novom Sadu

član: dr Mihajla Đan, vanredni profesor, Genetika, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju u Novom Sadu

član: dr Sava Lazić, naučni savetnik, Mikrobiologija i zarazne bolesti - imunologija i virusologija, Naučni institut za veterinarstvo “Novi Sad” u Novom Sadu; vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monograph documentation
DT
Type of record: Textual printed material
TR
Contents code: PhD thesis
CC
Author: Gospava Lazić
AU
Mentor: Dr Petar Knežević, Associate Professor, microbiology,
MN 01.07.2015.
Dr Tamaš Petrović, Research Fellow, microbiology and
infectious diseases, 26.04.2016.
Title: Presence and prevalence of animal and human
TI viruses in surface water in Vojvodina Province.
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: eng. / srp.
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2016.
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publication place: Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty
PP of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description: 9 chapters, 209 pages, 74 figures, 15 tables, 324
PD references
Scientific field: Biology
SF
Scientific discipline: Microbiology, virology
SD
Subject, Key words: Surface water, Sewage, Human
SKW and Porcine adenovirus, Human norovirus, Hepatitis A
and E virus, Bovine polyomavirus, real time (RT)-PCR,
molecular typing, Serbia

UC

Holding data:

HD

Note:

N

Abstract:

AB

Faculty of Sciences Library, 21000 Novi Sad, Trg
Dositeja Obradovića 2, Republic of Serbia

No

Over 100 types of pathogenic viruses are excreted in human and animal wastes. The presence of human and animal pathogenic enteric viruses in water environments reflects fecal contamination and indicates a risk to public health. Republic of Serbia does not implement surveillance for the presence of pathogenic human and animal viruses in surface waters and even in drinking water, neither is the established methodology of these studies in any institution in Serbia. Accordingly, the aim of the study was to determine and analyze the presence of human and animal viruses in surface water, using the latest methods of concentration and detection of the viruses. Within the dissertation examined the presence of the following viruses in surface waters in Vojvodina: Human adenoviruses (HAdV), noroviruses (NoV) and hepatitis A virus), Porcine adenovirus (PAdV) and Bovine polyomavirus (BPyV) and Hepatitis E virus (HEV).

A total of 108 samples of surface water and waste water were collected from October 2012 to June 2014. The paper are applied the most advanced methods and the concentration of virus detection in water, which in Serbia are not used for this purpose. The conducted tests have proven that the animal and human viruses present in surface waters in Vojvodina. The most commonly detected virus in surface water was human adenovirus (42.4%), followed by Norovirus GI and GII (40.4% and 15.2%), Porcine adenovirus (11,1%), Bovine polyomavirus (7.07%) and hepatitis E virus (3,0%).

In total of nine analysed sewage samples human adenovirus was detected in 44,4% of samples. The prevalence of norovirus GII and GI in sewage samples was 66,7% and 22,2%. Bovine polyomavirus was detected in one of nine samples while porcine adenovirus and hepatitis E virus were not detected in any of analyzed samples. Hepatitis A virus was not detected in samples, but it has been experimentally confirmed that the methods applicable for detection of the virus. Based on the results of process control and yield determined the presence of virus in

samples, it was found that these methods can be successfully used to detect viral contamination of surface waters. Also, in these study was performed genotyping of viruses from selected samples by sequencing a part of the viral genome. Indirectly it is confirmed that the infection detected viruses present in a population of animals and humans. The presence of virus in samples of surface water and urban sewage reflects the infectious status of the population, but also constitutes a significant risk to the health of animals and people in the area that gravitates with tested waters.

Accepted on Senate on:

31.03.2014.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

president: dr Vesna Milošević, Full professor, Microbiology with parasitology and immunology, Faculty of Medicine in Novi Sad; Institute of Public Health of Vojvodina

mentor: dr Petar Knežević, Associate Professor, Microbiology, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, University of Novi Sad

mentor: dr Tamaš Petrović, Research Fellow, Microbiology and infectious diseases, Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" in Novi Sad

member: dr Mihajla Đan, Associate Professor, Genetika, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, University of Novi Sad

member: dr Sava Lazić, Research Fellow, Microbiology and infectious diseases-immunology and virology, Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" in Novi Sad; Associate Professor, Faculty of Agriculture in Novi Sad