

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ajda MIHORIČ

MOLEKULARNO DOLOČANJE ČLOVEŠKIH KALICIVIRUSOV V ŠKOLJKAH

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

MOLECULAR DETECTION OF HUMAN CALICIVIRUSES IN SHELLFISH

GRADUATION THESIS
university studies

Ljubljana, 2007

Z diplomskim delom zaključujem univerzitetni dodiplomski študij mikrobiologije. Diplomski naloga je bila opravljena v laboratoriju enote za virologijo na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je odobrila prijavitelno diplomsko delo in za mentorico imenovala prof. dr. Jožico Marin, za somentorico dr. Darjo Barlič-Maganja in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič-Županc.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin

Somentorica: dr. Darja Barlič-Maganja

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Jožica MARIN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: dr. Darja BARLIČ-MAGANJA

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Enota za virologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ajda MIHORIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 578.2+578.8:577.2.08(043)=863
KG *Caliciviridae*/kalicivirusi/norovirusi/školjke/izolacija RNA iz školjk/določanje kalicivirusov/molekularne metode/RT-PCR/RT-PCR v realnem času
AV MIHORIČ, Ajda
SA MARIN, Jožica (mentorica)/BARLIČ-MAGANJA, Darja (somentorica)/AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2007
IN MOLEKULARNO DOLOČANJE ČLOVEŠKIH KALICIVIRUSOV V ŠKOLJKAH
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP viii, 54 str., 12 pregl., 15 sl., 80 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Obolenja, povezana z zaužitjem okuženih školjk, so pogost pojav. Školjke med prehranjevanjem posledično koncentrirajo virusne delce. V fekalno onesnaženi vodi se virusni patogeni lahko ujamejo v školjkah. V industrijskih državah izbruhe gastroenteritisov najbolj pogosto povzročajo norovirusi iz družine *Caliciviridae*, za katere poznamo tudi to pot infekcije. Komercialna uporaba školjk narašča in zato se povečuje tudi prenos norovirusov. Ugotavljanje navzočnosti fekalnih bakterij se rutinsko uporablja za zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti školjk. Virusni delci pa so na splošno bolj odporni na okoljske dejavnike in jih manj uspešno odstranimo iz školjk med depuracijskimi postopki. Ker norovirusov ne moremo gojiti v celičnih kulturah, za njihovo dokazovanje v školjkah uporabljamo molekularne metode. Uporablja se klasična metoda RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Za dokazovanje virusne RNK moramo najprej uspešno osamiti RNK iz prebavnih žlez školjk. Primerjali smo štiri metode osamitve RNA. Virusno RNK smo dokazovali s klasično metodo RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Za dokazovanje norovirusov GGI in GGII smo uporabili različne začetne oligonukleotide.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.2+578.8:577.2.08(043)=863
CX *Caliciviridae*/caliciviruses/noroviruses/shellfish/RNA isolation from shellfish/detection of caliciviruses/molecular methods/RT-PCR/realtime RT-PCR
AU MIHORIČ, Ajda
AA MARIN, Jožica (supervisor)/BARLIČ-MAGANJA, Darja (co-advisor)/AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI MOLECULAR DETECTION OF HUMAN CALICIVIRUSES IN SHELLFISH
DT Graduation Thesis (University studies)
NO viii, 54 p., 12 tab., 15 fig., 80 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Disease caused by the consumption of shellfish containing pathogenic viruses of human origin is a well-known phenomenon. The shellfish concentrate viral particles as a consequence of their feeding process. When water is contaminated with human feces, viral pathogens may get trapped in the shellfish. Noroviruses, viruses of the family *Caliciviridae* are the most common cause of gastroenteritis outbreaks in industrialised countries and use this route of infection among others. Commercial use of shellfish is an expanding industry, which may increase the transmission of noroviruses. The presence of fecal indicator bacteria is routinely used for microbiological quality assurance of shellfish. However, the bacteria are not reliable indicators of the presence of enteric viruses in shellfish, as viral particles are generally more resistant to inactivation in water sources and are more slowly removed from shellfish by depuration. In the absence of culture methods for noroviruses, detection in foods relies on molecular techniques such as RT-PCR and real-time RT-PCR on extracted viral RNA. However, in order to obtain a successful detection it is of great importance to remove the tissue inhibitors during the viral RNA extraction. To select the most efficient RNA extraction method from shellfish we compared four protocols. Different RT-PCR, nested RT-PCR and real-time RT-PCR assays for detection of noroviruses GGI and GGII, respectively, were evaluated.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	iii
KEY WORDS DOCUMENTATION	iv
KAZALO VSEBINE	v
KAZALO SLIK	vii
KAZALO PREGLEDNIC	viii
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	ix
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZGODOVINA	2
2.2 KLASIFIKACIJA	2
2.3 STRUKTURA IN MORFOLOGIJA	4
2.4 GENOM IN PROTEINI	5
2.5 KLINIČNA SLIKA	6
2.6 PATOGENEZA	6
2.7 IMUNOST	6
2.7.1 Genetska dovzetnost	7
2.8 EPIDEMIOLOGIJA	7
2.8.1 Pojavljanje okužb	7
2.8.2 Prenos	9
2.8.3 Vloga školjk	9
2.9 DIAGNOSTIKA	10
2.9.1 Elektronska mikroskopija	10
2.9.2 Dokazovanje virusne nukleinske kisline	11
2.9.2.1 Reverzna transkripcija s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR)	11
2.9.2.2 Reverzna transkripcija s sledečo verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (Real Time RT-PCR)	12
3 MATERIAL IN METODE DE LA	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1. Vzorci	14
3.1.2 Materiali in reagenti za osamitev RNK	14
3.1.2.1 Osamitev RNK z reagentom TRIZOL (Invitrogen, ZDA)	14
3.1.2.2 Komplet reagentov za osamitev RNK NucleoSpin [®] RNA Plant in RNA II (MACHEREY-NAGEL, Nemčija)	15
3.1.2.3 Osamitev RNK z gvanidintiocianatom (GuSCN) in siliko	15
3.1.3 Encimi in reagenti pri metodi RT-PCR, PCR in RT-PCR v realnem času	15
3.1.3.1 Reagenti za RT-PCR (Promega, ZDA)	15
3.1.3.2 Reagenti za PCR (Promega, ZDA)	16
3.1.3.3 Reagenti za RT-PCR v realnem času SuperScript [™] III Platinum [®] One-Step Quantitative RT-PCR with ROX (Invitrogen, ZDA)	16
3.1.4 Pufri in reagenti za elektroforezo v agaroznem gelu	16
3.1.5 Laboratorijske aparature in drobna oprema	17
3.1.6 Začetni oligonukleotidi in sonde	18
3.2 METODE DE LA	21
3.2.1 Umetna okužba školjk	21

3.2.2 Priprava hepatopankreasov školjk za izolacijo RNK.....	21
3.2.3 Izolacija RNK.....	21
3.2.3.1 Metoda z reagentom TRIZOL (Invitrogen, ZDA).....	21
3.2.3.2 Metoda z reagentom TRIZOL (Invitrogen, ZDA) in PLG (Eppendorf, Nemčija)	22
3.2.3.3 Metoda s kompletom NucleoSpin® RNA Plant (MACHEREY-NAGEL, Nemčija).....	22
3.2.3.4 Metoda s kompletom NucleoSpin® RNA II (MACHEREY-NAGEL, Nemčija)	23
3.2.3.5 Metoda z GuSCN in siliko	23
3.2.4 Hkratna reakcija reverzne transkripcije in pomnoževanja z zunanjimi začetnimi oligonukleotidi (RT-PCR)	24
3.2.5 PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi	25
3.2.6 Analiza produktov RT-PCR in PCR z elektroforezo v agaroznem gelu	26
3.2.7 Hkratna reakcija reverzne transkripcije in pomnoževanja z zunanjimi začetnimi oligonukleotidi v realnem času (Real Time RT-PCR)	27
4 REZULTATI.....	29
4.1 DOKAZOVANJE NOROVIRUSOV S KLASIČNO METODO RT-PCR	29
4.1.1 Pregled vzorcev iz referenčnega laboratorija Evropske unije	29
4.1.2 Dokazovanje norovirusov GGI v vzorcih iztrebkov	34
4.2. REZULTATI DOLOČANJA NOROVIRUSOV Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU	35
4.2.1 Dokazovanje norovirusov genske skupine I z metodo RT-PCR v realnem času.....	35
4.2.2 Dokazovanje norovirusov genske skupine II z metodo RT-PCR v realnem času	37
4.3 PREGLED UMETNO OKUŽENIH ŠKOLJK.....	38
4.4 REZULTATI PREGLEDA ŠKOLJK	41
5 RAZPRAVA.....	42
5.1 SKLEPI.....	46
6 POVZETEK.....	47
7 VIRI	49

KAZALO SLIK

Slika 2-1: Grafična predstavitev kapsidnega proteina norovirusov (Prasad in sod., 2000: 320)	5
Slika 2-2: Shema genoma virusa Norwalk (Rockx, 2004: 12).....	5
Slika 2-3: Gibanje kalicivirusnih drisk po mesecih, Slovenija, 2003 – 2004 (Epidemiološko spremljanje..., 2006: 35).....	8
Slika 2-4: Elektronsko mikroskopski posnetek kalicivirusov v iztrebku bolnika (Dolenc, 2007: 15)	11
Slika 4-1: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol/PLG, z metodo GuSCN/silika ter z metodo NucleoSpin® RNA Plant. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov G1SKF/G1SKR	30
Slika 4-2: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol/PLG, z metodo GuSCN/silika ter z metodo NucleoSpin® RNA Plant. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov G2SKF/G2SKR	31
Slika 4-3: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov G1SKF/G1SKR (levo) in G2SKF/G2SKR (desno).....	32
Slika 4-4: Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR. PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov Ando/E3	33
Slika 4-5: Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR. Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov NI/E3.....	34
Slika 4-6: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol. Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov CapA/CapB (levo) in par G1/SM31 (desno).....	35
Slika 4-7: Pomnoževalni diagram v linearni obliki pri RT-PCR v realnem času s sondo TaqMan JJVI za 100 – kratno redčitev RNK izolirane iz vzorca 2299/04	36
Slika 4-8: Pomnoževalni diagram v linearni obliki pri RT-PCR v realnem času s sondo TaqMan NVGGI za RNK izolirano iz vzorca 1998/04 z reagentom Trizol.....	37
Slika 4-9: Pomnoževalni diagram v linearni obliki pri RT-PCR v realnem času s sondo TaqMan RING2 za RNK izolirano iz vzorca 2028/05 z reagentom Trizol.....	38
Slika 4-10: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo izolirali iz vzorcev z reagentom Trizol/PLG. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I..	39
Slika 4-11: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z metodo NucleoSpin® RNA Plant (levo) in metodo NucleoSpin® RNA II (desno). Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Razdelitev virusov iz družine <i>Caliciviridae</i> (ICTV, 2006).....	2
Preglednica 2-2: Razvrstitev človeških norovirusov (Koopmans in sod., 2002b: 519)	3
Preglednica 2-3: Kriptogrami za nekatere noroviruse (Rockx, 2004: 11).....	4
Preglednica 3-1: Začetni oligonukleotidi in sonde	19
Preglednica 3-2: Reakcijska mešanica za RT-PCR (Access RT-PCR, Promega, ZDA) ..	24
Preglednica 3-3: Pogoji za RT-PCR.....	25
Preglednica 3-4: Reakcijska mešanica za PCR	25
Preglednica 3-5: Pogoji za PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi.....	26
Preglednica 3-6: Reakcijska mešanica za RT-PCR v realnem času.....	27
Preglednica 3-7: Pogoji za RT-PCR v realnem času.....	28
Preglednica 4-1: Vzorci in vrednosti Ct pri RT-PCR v realnem času z COG2F/COG2R in sondo TaqMan RING2	37
Preglednica 4-2: Vzorci in vrednosti Ct pri RT-PCR v realnem času z COG2F/COG2R in sondo TaqMan RING2	41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMV	- virus ptičje mieloblastoze (angl.: Avian Myeloblastosis Virus)
bp	- bazni par
cDNK	- komplementarna DNK (angl.: complementary DNA)
ddH ₂ O	- demineralizirana destilirana voda
DNK	- deoksiribonukleinska kislina
dNTP	- deoksinukleotid trifosfat
GGI	- genska skupina I
GGII	- genska skupina II
GGIII	- genska skupina III
ORF	- odprti bralni okvir (angl.: Open Reading Frame)
PCR	- verižna reakcija s polimerazo (angl.: Polymerase Chain Reaction)
PLG	- angl.: Phase Locking Gel
RNK	- ribonukleinska kislina
RT	- reverzna transkripcija
SS III	- Super Script III
<i>Taq</i>	- <i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tfl</i>	- <i>Thermus flavus</i>

1 UVOD

Obolenja povezana z zaužitjem školjk, še posebej surovih ostrig, so poznan pojav. V primerih okužb povezanih s hrano ponavadi pride do kontaminacije s strani pripravljavcev hrane. V tem primeru temu ni tako. Školjke se prehranjujejo s filtracijo vode in posledično koncentrirajo virusne delce v fekalno onesnaženi vodi. Norovirusi iz družine *Caliciviridae* predstavljajo glavni problem pri okužbah, ki so povezane z uživanjem školjk (Myrmel in sod., 2004; Schultz in sod., 2007). Povzročajo 60 – 80 % akutnih gastroenteritisov v Evropi, Združenih državah Amerike in Avstralji (Zheng in sod., 2006). Okužba z norovirusi ni nevarna. Težave so običajno kratkotrajne, bolnik spontano ozdravi brez posledic. Nevšečnosti, ki se pojavijo pri okužbi, so bruhanje, glavobol, slabost, bolečine v trebuhu in povišana telesna temperatura (Caul in sod., 1996).

Norovirusov ne moremo gojiti v celični kulturi, zato za njihovo dokazovanje v vzorcih hrane uporabljamo molekularne metode. Med njimi se je za najbolj uspešno izkazala verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). S to metodo dokazujemo v školjkah virusno RNK, ki jo moramo najprej osamiti iz prebavne žleze školjk, kjer se koncentrirajo virusni delci. Pri tem je zelo pomembno, da izberemo ustrezno metodo, s katero osamimo zelo majhne količine virusne RNK v čisti obliki brez navzočnosti inhibitorjev encimske reakcije (Schultz in sod., 2007).

Norovirusi so genetsko zelo heterogena skupina. Zato je pomembno, da za izvajanje RT-PCR izberemo ustrezne začetne oligonukleotide, s katerimi lahko pomnožujemo genom različnih norovirusnih genotipov (Jothikumar in sod., 2005).

1.1 NAMEN DELA

Namen naloge je bil, da primerjamo učinkovitost in občutljivost štirih različnih metod osamitve RNK iz prebavnih žlez školjk. Za dokazovanje norovirusov genske skupine I (GGI) in II (GGII) smo uporabili različne začetne oligonukleotide. Virusno RNK pa smo dokazovali s klasično metodo RT-PCR in z metodo RT-PCR v realnem času.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA

Gastroenteritis predstavlja eno najpogostejših nalezljivih bolezní pri človeku. Simptome je že pred skoraj osemdesetimi leti opisal Zahorsky (Zahorsky, 1929; Lopman, 2002). V zimskem obdobju med letoma 1946 – 1947 je v zdravstvenih ustanovah in zaporih v New Yorku prišlo do izbruha gastroenteritisa. Z bakteriološkimi testi in posmrtnimi pregledi niso odkrili etiološkega povzročitelja. Pri nadaljnji raziskavi so vzorce iztrebkov okuženih oseb centrifugirali in supernatante filtrirali skozi filtre, nepropustne za bakterije. S filtratom so nato peroralno okužili prostovoljce, ki so po okužbi zboleli (Gordon, 1947). Leta 1968 je v mestu Norwalk izbruhnila epidemija gastroenteritisa. Povzročitelj ni bila bakterija, prav tako ne virus, ki bi ga lahko gojili v tkivnih kulturah (Hauffman in sod., 2003; Lopman, 2002). Prvi človeški kalicivirus je leta 1972 opisal Kapikian. V vzorcu iztrebka iz leta 1968 je z imuno-elektronsko mikroskopijo našel 27 nm velik virusni delec (Hauffman in sod., 2003; Kapikian, 1972; Lopman, 2002).

2.2 KLASIFIKACIJA

Obstoj družine *Caliciviridae* so uradno potrdili leta 1979. Za novo družino virusov z linearno molekulo pozitivno polarne enovijačne RNK so med skupne lastnosti navedli en glavni strukturni protein, iz katerega je zgrajena kapsida, ki ima na površini ikozaedričnega viriona 32 vdolbinic v obliki čašic. Virusi iz družine so razdeljeni v štiri rodove: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* in *Norovirus* (Preglednica 2-1) (Green in sod., 2000). Predstavniki slednjih dveh rodov pri ljudeh povzročajo gastroenteritis (Rockx, 2004).

Preglednica 2-1: Razdelitev virusov iz družine *Caliciviridae* (ICTV, 2006).

Družina	Rod	Referenčna vrsta
<i>Caliciviridae</i>	<i>Vesivirus</i>	virus vezikularnega eksantema prašičev
	<i>Lagovirus</i>	virus kunčje hemoragične bolezni
	<i>Sapovirus</i>	virus Sapporo
	<i>Norovirus</i>	virus Norwalk

Do leta 2000 so v družino *Caliciviridae* uvrščali tudi virus hepatitisa E. Na predlog skupine za študije taksonomije družine *Caliciviridae* je mednarodni odbor za taksonomijo virusov (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) virus hepatitisa E odstranil iz družine in trenutno ni uvrščen v nobeno družino (Green in sod., 2000).

Zaradi raznolikosti (Green in sod., 1993) je rod *Norovirus* razdeljen na tri genske skupine (GGI, GGII, GGIII), ki se razlikujejo predvsem v nukleotidnem zaporedju gena za kapsidni protein (Ando in sod., 1995; Ando in sod., 2000). Zaradi razlik, ki so lahko v zaporedju aminokislin tudi do 50 %, pa noroviruse delimo še na podtip (Preglednica 2-2). V posamezen podtip spadajo sevi, ki imajo več kot 80 % podobnost v zaporedju aminokislin (Ando in sod., 2000; Vinje in Koopmans, 2000). Sevi človeških virusov spadajo v genski skupini GGI in GGII. Seve iz genske skupine GGIII so do sedaj odkrili le pri govedu in naj ne bi predstavljali nevarnost za okužbo pri človeku (Oliver in sod., 2003).

Preglednica 2-2: Razvrstitev človeških norovirusov (Koopmans in sod., 2002b: 519).

Družina	Rod	Genska skupina	Genotip	Referenčni sev
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	GGI	1	Norwalk
			2	Southampton
			3	Desert Shield
			4	Chiba
			5	Musgrove
			6	Hesse
			7	Winchester
		GGII	1	Hawaii
			2	Melksham
			3	Mexico
			4	Lordsdale
			5	Hillingdon
			6	Seacroft
			7	Leeds
			8	Amsterdam

Za lažje sporazumevanje med raziskovalci se kalicivirusi označujejo s kriptogramom, ki vsebuje: izvorno gostiteljsko vrsto / rod / gensko skupino / imenovanje seva / leto odkritja / izvorno državo (Preglednica 2-3) (Green in sod., 2000).

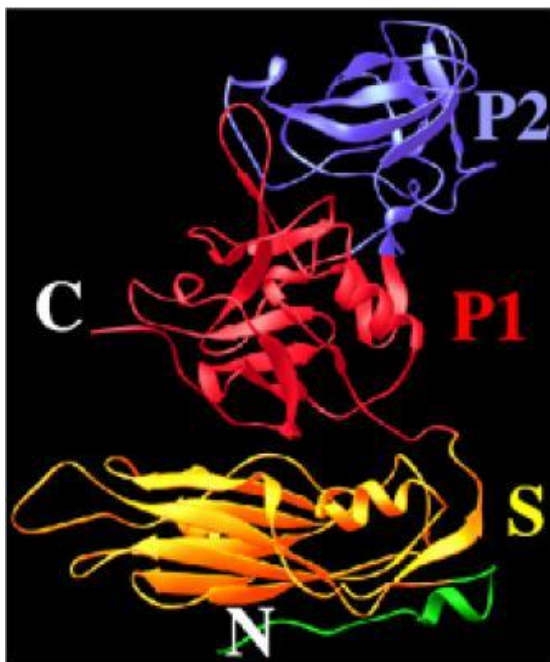
Preglednica 2-3: Kriptogrami za nekatere noroviruse (Rockx, 2004: 11).

Ime virusa	Kriptogram
virus Norwalk	Hu/NV/I/Norwalk/1968/US
virus Lordsdale	Hu/NV/II/Lordsdale/1993/UK
virus Mexico	Hu/NV/II/Mexico/1989/US
virus Hawaii	Hu/NV/II/Hawaii/1971/US
virus Leeds	Hu/NV/II/Leeds/1990/UK
goveji norovirus CH126	Bo/NV/III/CH126/1998/NL

2.3 STRUKTURA IN MORFOLOGIJA

Kalicivirusi so goli ikozaedrični virusi s premerom 27 – 38 nm (Caul, 1996). Strukturni protein, ki se prepiše iz ORF2, tvori virusno kapsido. Za viruse iz družine *Caliciviridae* so značilne udrtine v obliki čašic, ki jih vidimo pod elektronskim mikroskopom. Ime družine izvira iz latinske besede *calix*, ki pomeni skodelica, čaša ali kelih (Green in sod., 2000). Norovirusi ne izražajo vedno značilnih udrtin. Posledično so jih pogosto označilevali za majhne okrogle viruse (Hauffman in sod., 2003).

Z rentgensko kristalografijo (resolucija 2.3 Å) so pri norovirusih določili dve kapsidni domeni: skorjo (S) in štrleče roke (P). Kapsidni protein ima štrlečo domeno (P2), ki je preko zgiba (P1) vezana na domeno S (Slika 2-1). Slednja je sestavljena iz osmih β -listov (Prasad in sod., 2000). Štrleča domena proteina je pomembna za vezavo norovirusa na sesalske celice (Hardy, 2005).

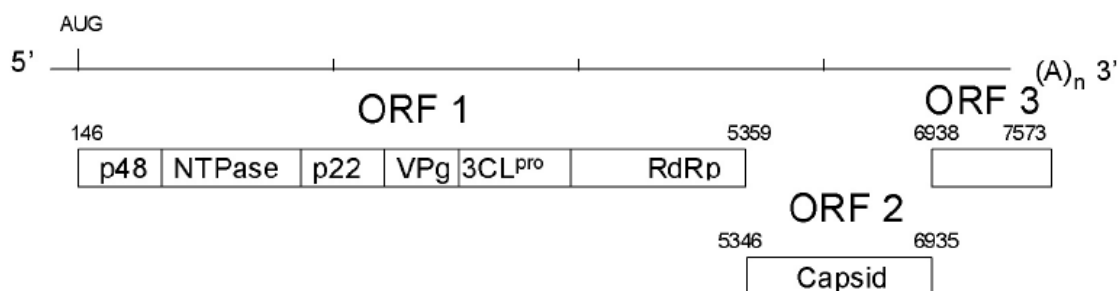


Slika 2-1: Grafična predstavitev kapsidnega proteina norovirusov (Prasad in sod., 2000: 320).

2.4 GENOM IN PROTEINI

Genom virusov iz družine *Caliciviridae* je linearna, pozitivno polarna enovijačna molekula RNK dolžine 7,5 kb. Značilna razporeditev odprtih bralnih okvirjev jih jasno loči od družine *Picornaviridae* (Clarke in Lambden, 1997). Genom ni segmentiran in vsebuje 48-55.8 % gvanina in citozina. Genom ima na 5' koncu kovalentno vezan protein (VPg), na 3' koncu pa ima poli-A rep (ICTV, 2006).

Genom ima tri odprte bralne okvirje (ORF). Najdaljši je prvi (ORF1), ki nosi zapis za 6 nestrukturiranih proteinov, ki si sledijo od N proti C koncu ORF1: p48, NTPaza, p22, VPg, 3C-podobna proteaza in od RNK odvisna RNK polimeraza (RdRp). Drugi bralni okvir (ORF2) nosi zapis za kapsidni protein, tretji bralni okvir (ORF3) pa za majhen bazičen protein (Slika 2-2) (Clarke in Lambden, 1997; Vinje in sod., 2003).



Slika 2-2: Shema genoma virusa Norwalk (Rockx, 2004: 12).

2.5 KLINIČNA SLIKA

Okužba s kalicivirusi je blaga in mine sama po sebi. Povzroča blage do zmerne driske, trebušne krče in slabost. Za okužbe z norovirusi je značilno bruhanje. Povišana temperatura je redka. Okužbo lahko spremljajo tudi glavoboli, omotičnost, mrzlica in krči. V iztrebku navadno ni krvi. Simptomi se pojavijo 24 – 28 ur po okužbi in trajajo 12 – 60 ur (Adler in Zickl, 1969; Caul in sod., 1996; Gordon in sod., 1947). Pri ostarelih osebah lahko nespecifični simptomi kot so žeja, anoreksija, zaspanost in omotica trajajo do 19 dni po okužbi (Goller in sod., 2004).

Do 32 % okužb je lahko asimptomatskih (Graham in sod., 1994).

Pri okužbi prostovoljcev z norovirusom se je virus v iztrebku pojavil že po 15 urah. Običajno je v 1 g iztrebka 10^6 virusnih delcev. Največje koncentracije (10^9 virusnih delcev/g iztrebka) so med 25 – 72 uro, virus v iztrebku pa izhaja 7 do 14 dni po okužbi (Graham in sod., 1994).

2.6 PATOGENEZA

Iz vzorcev biopsije črevesja prostovoljcev pred in po okužbi z virusi Norwalk (GGI) in Hawaii (GGII) so ugotovili, da se norovirusi razmnožujejo v tankem črevesju. Pod mikroskopom je vidno vnetje sluznice, razširjene in tope črevesne resice in skrajšane mikrovile ter intracelularni edem. Spremembe so opazne 24 ur po okužbi in trajajo do 14 dni (Schreiber in sod., 1973; Schreiber in sod., 1974).

S svetlobno in elektronsko mikroskopijo so opazili lezije v sluznici tankega črevesa (Lopman in sod., 2002).

2.7 IMUNOST

Odpornost na okužbo z norovirusi ni dobro poznana. V študijah s prostovoljci so odkrili, da nekateri lahko razvijejo kratkotrajno imunost po eni okužbi, drugi pa dolgotrajno imunost po večkratni izpostavljenosti (Parrino in sod., 1977).

Leta 1998 se je v skupnosti prvobitnih naseljencev Avstralije skupina obiskovalcev okužila z norovirusi s hrano. Od avtohtonih prebivalcev ni zbolel nihče, čeprav so jedli isto hrano

(Ewald in sod., 2000). Trajno odpornost je možno pripisati pogosti izpostavljenosti ali razlikam v genetski dovzetnosti (Lopman in sod., 2002).

S serološkimi testi so ugotovili navzkrižno reaktivnost protiteles proti različnim sevom norovirusov skupine GGI. Genetsko podobni sevi skupine GGII so antigensko različni (Lopman in sod., 2002).

2.7.1 Genetska dovzetnost

Dovzetnost za okužbo z norovirusi je povezana s fenotipom krvne skupine AB0. Osebe s fenotipom 0 so mnogo bolj dovzetne za okužbo kot osebe s fenotipom B in AB. A, B in 0 so antigeni (oligosaharidi), ki so na površini krvnih celic in epitelu sluznice dihalnega, urogenitalnega in prebavnega trakta ter prosti v telesnih tekočinah. Antigen B se lahko veže s P2 kapsidnega proteina, spremeni vezavno mesto in s tem omogoča imunost. Antigen A zmanjša sposobnost vezave virusa (Tan in Jiang, 2005; Hutson in sod., 2002).

2.8 EPIDEMIOLOGIJA

V zadnjih letih se je izkazalo, da so kalicivirusi glavni povzročitelji nebakterijskih gastroenteritisov v vseh starostnih skupinah (Dasselberger in Gray, 2005; Hutson in sod., 2004; Rockx in sod., 2002).

Pri ugotavljanju norovirusov ob prijavljenih izbruhih so ugotovili znatno variabilnost genotipov. Prevladujejo sevi genske skupine II, ki so najpogostejši v Združenih državah Amerike, evropskih državah in v Avstraliji (Billgren in sod., 2002; Fankhauser in sod., 1998, 2002; Sánchez-Fauquier in sod., 2005).

Število dokazanih sevov genske skupine I narašča. Delni razlog za pogostejše odkrivanje teh norovirusov je uporaba novih začetnih oligonukleotidov, ki so bolj učinkoviti za detekcijo sevov iz skupine GGI (Fankhauser in sod., 2002).

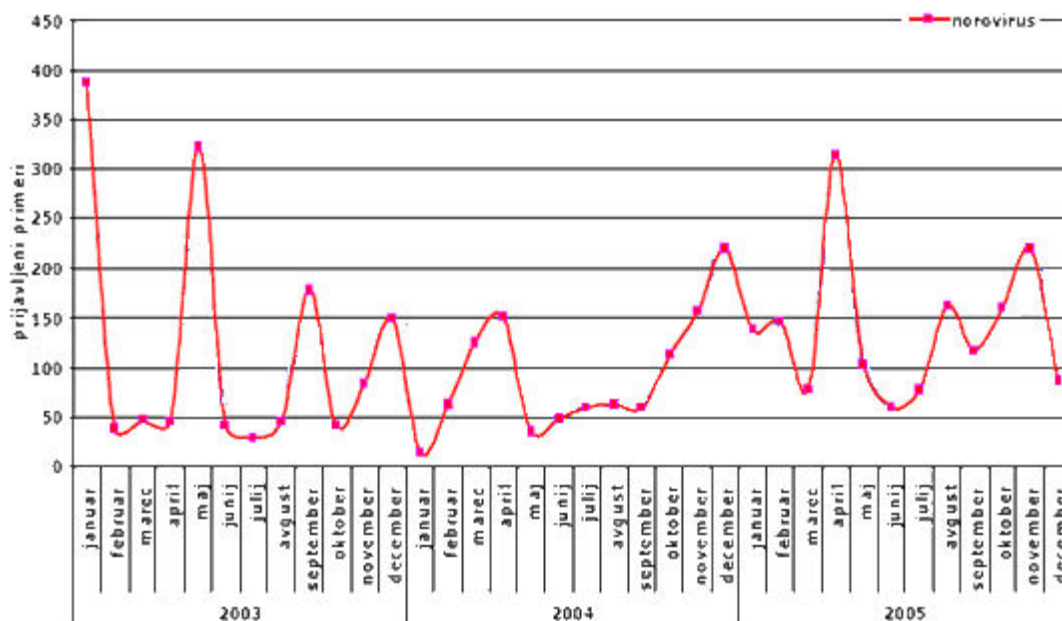
2.8.1 Pojavljanje okužb

Kalicivirusi se pojavljajo sezonsko z epidemičnim vrhom v hladnih mesecih. Zahorsky je leta 1929 simptome poimenoval kot »zimsko bljuvalno bolezen« (Zahorsky, 1929; Lopman in sod., 2002).

Pri analizi rezultatov 12 raziskav sporadičnih primerov in epidemičnih izbruhov med leti 1978 in 1998 so ugotovili, da so okužbe z norovirusi najpogostejše v hladnih mesecih. Sezonsko se pojavljajo v ustanovah (bolnišnicah, domovih starejših občanov in zaporih) in v izbruhih, povezanih s kontaminirano hrano. Najbolj izrazito je pojavljanje okužb v hladnih mesecih na Japonskem, Nizozemskem in v Kanadi ter najmanj v Veliki Britaniji in Združenih državah Amerike (Mounts in sod., 2000). V Veliki Britaniji je bilo leta 2002 največ prijavljenih primerov poleti (Lopman in sod., 2003).

V ZDA je raziskava 348 izbruhov med leti 1996 in 2000 pokazala, da je do 39 % izbruhov prišlo v restavracijah, 29 % so jih ugotovili v domovih starejših občanov in v bolnišnicah, 12 % v šolah in vrtcih ter 10 % v počitniških nastanitvah, vključno z ladjami na križarjenjih (Fankhauser in sod., 1998; Norwalk-like viruses..., 2001). Znale so tudi epidemije na ameriških letalonosilkah (McCarthy in sod., 2000).

V letu 2005 je bilo v Sloveniji 1666 prijav norovirusnih drisk. Obolevale so osebe vseh starosti, večinoma otroci, mlajši od 14 let. V letu 2004 je bilo zabeleženih 22 izbruhov, ki so jih povzročili kalicivirusi. Izbruhi so se pojavljali predvsem v vrtcih, domovih starejših občanov ter hotelsko – gostinskih obratih. Okužbe s kalicivirusi so se pojavile tudi v socialno – varstvenih zavodih, bolnišnici in v osnovni šoli. V letih 2003 – 2005 je bilo pojavljanje okužb s kalicivirusi najbolj izrazito v zimskih in pomladnih mesecih (Slika 2-3) (Epidemiološko spremljanje..., 2006).



Slika 2-3: Gibanje kalicivirusnih drisk po mesecih, Slovenija, 2003 – 2004 (Epidemiološko spremljanje..., 2006: 35).

2.8.2 Prenos

Poznanih je več načinov prenosa človeških kalicivirusov. Najpogosteje se okužba prenaša po fekalno – oralni poti, čeprav je tudi prenos po zraku pomemben pri širjenju epidemij (Norwalk-like viruses..., 2001).

Najbolj pogost vir okužbe je hrana, predvsem školjke, sledi prenos iz osebe na osebo in nazadnje okužba s kontaminirano vodo (Fankhauser, 1998; Norwalk-like viruses..., 2001).

Epidemični izbruhi so pogosto posledica kombinacije različnih poti prenosa (Lopman in sod., 2002).

K uspešnemu prenosu norovirusov pripomore nizka infekcijska doza (<100 virusnih delcev), podaljšano asimptomatsko izločanje virusov, odpornost virusov do 0.001 % raztopino klora in odpornost na zamrzovanje ter segrevanje do 60 °C, raznolikost sevov in možnost ponovne infekcije zaradi pomanjkanja trajne imunosti (Norwalk-like viruses..., 2001).

2.8.3 Vloga školjk

Školjke pridobivajo hrano s precejanjem morske vode. Človeški kalicivirusi se sicer ne razmnožujejo v školjkah, jih pa koncentrirajo iz kontaminirane vode. Zaradi nevarnosti prenosljivih bolezni, povezanih z uživanjem školjk, je večina držav sprejela sanitarne ukrepe. V Evropski uniji so leta 1993 sprejeli posebne predpise (European Directive 91/492/EEC), ki določajo testiranje školjk in vode, v kateri jih gojijo, na določene bakterije (*Salmonella* in *Escherichia coli*) z bakteriološkimi analizami. Bakteriološki nadzor je dober pokazatelj fekalnega onesnaženja, vendar so lahko školjke, ki ustrezajo bakteriološkemu standardu še vedno onesnažene z virusi. Virusi dlje preživijo v morskem okolju kot bakterijski patogeni. Tudi depuracijski postopki, ki uspešno odstranijo iz školjk bakterije, iz njih ne odstranijo virusov (Lees, 2000; Lopman in sod., 2002; Norwalk-like viruses..., 2001; Shieh in sod., 2000).

2.9 DIAGNOSTIKA

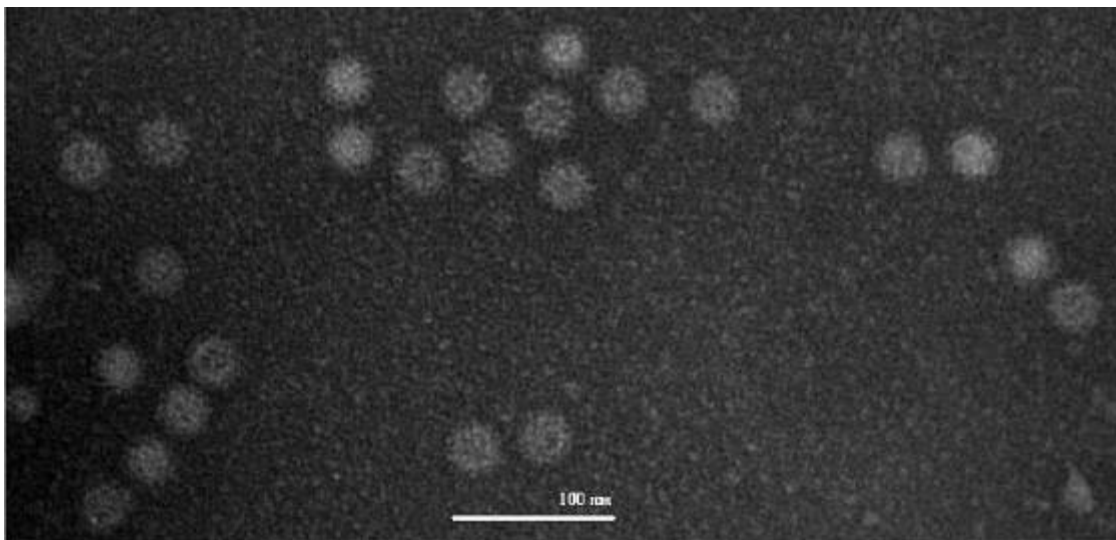
2.9.1 Elektronska mikroskopija

Za izolacijo ali razmnoževanje človeških kalicivirusov še ni razvit sistem celične kulture ali živalski model (Duizer in sod., 2004; Schwab in sod., 2000). Diagnostika se je zato tradicionalno zanašala na elektronsko mikroskopijo in jo nekaj referenčnih laboratorijev še vedno uporablja za rutinsko preiskavo vzorcev ob izbruhih bolezni (Vennema in sod., 2002).

Diagnostika enteričnih virusov v vzorcih iztrebkov z direktno elektronsko mikroskopijo zahteva visoko usposobljene strokovnjake za mikroskopijo, drago opremo in je sorazmerno neobčutljiva. Da lahko noroviruse dokažemo z elektronskim mikroskopom, mora biti koncentracija virusnih delcev $10^5 - 10^6$ na ml suspenzije iztrebka (Koopmans in sod., 2002a; Atmar in Estes, 2001). Dokazovanje človeških kalicivirusov s to metodo je lahko uspešno le približno 48 ur po prenehanju simptomov, ko je koncentracija virusov v iztrebkih še dovolj visoka (Atmar in Estes, 2001).

V večini laboratorijev pripravijo 10 – 20 % suspenzije iztrebka z gojiščem za tkivno kulturo ali s fosfatnim pufrom. Viruse lahko kasneje koncentrirajo s precipitacijo z amonijevim sulfatom ali z ultracentrifugiranjem. Za negativno kontrastiranje virusnih delcev se uporablja fosforvolframova kislina, amonijev molibdat ali uranilni acetat (Atmar in Estes, 2001).

Problem predstavljajo norovirusi, ki nimajo tipične morfologije kalicivirusov (Slika 2-4), in jih zato težje prepoznamo pod elektronskim mikroskopom (Hauffman in sod., 2003).



Slika 2-4: Elektronsko mikroskopski posnetek kalicivirusov v iztrebku bolnika (Dolenc, 2007: 15).

2.9.2 Dokazovanje virusne nukleinske kisline

2.9.2.1 Reverzna transkripcija s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR)

Za dokazovanje RNK norovirusov uporabljamo reverzno transkripcijo s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR). Prvič je to metodo opisal leta 1992 Jiang s sodelavci. (Jiang in sod., 1992).

Poznavanje nukleotidnega zaporedja genomov ali pa tudi le njihovih delnih odsekov je omogočilo razvoj občutljivih in specifičnih metod RT-PCR za dokazovanje norovirusov (Vennema in sod., 2002). Metoda RT-PCR je v primerjavi z elektronsko mikroskopijo bolj občutljiva diagnostična metoda (Lopman in sod., 2002).

Sestavljena je iz procesa prepisovanja virusne RNK v komplementarno DNK (cDNK) in procesa pomnoževanja dobljene cDNK. Verižna reakcija s polimerazo je metoda encimske sinteze nukleinskih kislin, s katero *in vitro* lahko v kratkem času pomnožimo 10^n (n = število ciklov) značilen odsek DNK. Reakcija temelji na vezavi in podaljševanju dveh začetnih oligonukleotidov, ki omejujeta tarčni odsek DNK (Erlich in sod., 1991). Za pravilno izbiro začetnih oligonukleotidov, ki sta komplementarna mejnima odsekoma tarčne DNK, je potrebno poznavanje oligonukleotidnega zaporedja vsaj dela tarčne DNK. Po denaturaciji DNK se začetna oligonukleotida vežeta na komplementarno vijačnico DNK in sinteza nove verige poteka med njima. Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) sestavljajo trije cikli:

- denaturacija DNK pri 94 °C do 98 °C

- vezava začetnih oligonukleotidov pri 37 °C do 65 °C (odvisno od vsebnosti G in C nukleinskih baz)
- sinteza nove verige DNK na osnovi tarčne DNK pri ~72 °C

Veriga DNK, sintetizirana v ciklu 'n', služi kot matrica za sintezo nove verige v ciklu 'n + 1', zato je rezultat ponavljajočih ciklov eksponentno naraščanje števila kopij tarčnega oseka DNK. Dolžina produkta PCR je enaka vsoti dolžin obeh začetnih oligonukleotidov in razdalje med njima. Z metodo PCR lahko pomnožujemo dvojno ali enojno vijačnico DNK ter cDNK, ki smo jo dobili s predhodnim prepisom RNK (Erlich in sod., 1991).

V verižni reakciji s polimerazo sodelujejo poleg tarčne DNK še začetna oligonukleotida, mešanica deoksinukleotidtrifosfatov (dATP, dCTP, dGTP in dTTP), termostabilna, od DNK odvisna DNK polimeraza, magnezijevi ioni, ki so potrebni za aktivnost polimeraze in ustrezen pufer (Arnheim in Erlich, 1992).

Občutljivost reakcije lahko povečamo z dodatnim pomnoževanje prvega produkta PCR. Pri tem uporabimo notranje začetne oligonukleotide in pomnožujemo odsek DNK znotraj prvega produkta PCR (Green in sod, 1998).

Po končani PCR je potrebno produkte še analizirati z elektroforezo v agaroznem gelu.

2.9.2.2 Reverzna transkripcija s sledečo verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (Real Time RT-PCR)

Ta reakcija je kombinacija reverzne transkripcije RNK v cDNK, pomnoževanja cDNK in detekcije produkta v realnem času (Gibson in sod., 2007).

PCR v realnem času omogoča spremljanje pomnoževanja tarčnega odseka med potekom reakcije in s tem zaznavo produkta že v zgodnji fazi reakcije. Zaznavanje produkta temelji na fluorescenci. Možni sta dve različici metode; z barvilom SYBR[®] Green in z označenimi sondami TaqMan[®]. Barvilo SYBR[®] Green se veže v mali žleb dvovijačnice DNK. Pri vezavi barvila se sprošča fluorescenca. Fluorescenca narašča z nastankom novih dvovijačnih molekul DNK. Z razliko od barvila SYBR[®] Green, ki se veže na katerokoli dvovijačno molekulo DNK, so označene sonde TaqMan[®] specifične za izbrano zaporedje. 5' nukleazna aktivnost *Taq* polimeraze DNK in resonančni prenos fluorescenčne energije (angl. Fluorescent Resonant Energy Transfer) omogočata spremljanje pomnoževanja tarčnega oseka DNK/RNK. Na 5' koncu sond TaqMan[®] je visoko energijsko reportersko barvilo (angl. Reporter), na 3' koncu pa nizko energijsko dušilno barvilo (angl. Quencher).

Ko je vsa sonda vzburljena s svetlobno energijo, se emisija poročevalnega barvila prenese na dušilno barvilo in signal je zadušen. Med reakcijo pomnoževanja se sonda veže na tarčni odsek verige DNK med obema začetnima oligonukleotidoma. Ko poteka sinteza nove verige DNK, *Taq* polimeraza DNK s 5' nukleazno aktivnostjo razgradi sondo, ki ji je napoti. Posledično barvilo nista več v zadostni bližini in signal ni zadušen. Kot rezultat nam program prikaže disociacijsko krivuljo in sicer spremembo signala poročevalnega barvila v odvisnosti od cikla reakcije. Bazna linija je meja, pri kateri fluorescenčni signal preseže ozadje reakcije. Cikel, v katerem vzorci dosežejo bazno linijo, imenujemo cikel praga reakcije (Ct –angl. treshold cycle). Bazna linija in cikel praga reakcije sta ključna podatka za določanje količine izvornega materiala (Gibson in sod., 2007; Nolan in sod., 2006; Real-Time PCR..., 2006).

Poznavanje za gensko skupino značilnega nukleotidnega zaporedja kapsidnega gena (Katayama in sod., 2002; Vinje in sod., 2004) in nizek zaznavni prag omogočata uporabo metode RT-PCR v realnem času za določanje norovirusov v školjkah, hrani in okolju (Jothikumar in sod., 2005; Vinje in sod., 2004).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

3.1.1. Vzorci

- 24 školjk (*Mytilus edulis*) iz Piranskega zaliva
- vzorci iz referenčnega laboratorija Evropske unije:
 - po 2 tihomorski ostrigi (*Crassostrea gigas*) (BM1, BM2)
 - po 1 ml supernatantov (A, B, C, D, E, F)

Katero gensko skupino norovirusov so vsebovali vzorci smo izvedeli naknadno.

- vzorci iztrebkov (20 % suspenzija v 0,1 M PBS) bolnikov obolelih za gastroenteritisom, pri katerih je bila kalicivirusna (Norovirus GGI in GGII) okužba dokazana z elektronsko mikroskopijo in/ali RT-PCR:
 - vzorci z dokazano navzočnostjo norovirusov skupine GGI: 1998/04
 - vzorci z dokazano navzočnostjo norovirusov skupine GGII: 905/05, 915/05, 2028/05
- izolirana RNK GGI (redčitev 10^{-2})
- dva hepatopankreasa vsakega od 16 vzorcev po 12 školjk iz Piranskega zaliva (Strunjan, Seča, Fiesa in Debeli rtič) in enega vzorca 12 školjk, uvoženih iz Grčije, zbranih v obdobju od jeseni 2004 do pomladi 2006

3.1.2 Materiali in reagenti za osamitev RNK

3.1.2.1 Osamitev RNK z reagentom TRIZOL (Invitrogen, ZDA)

- proteinaza K, 20 mg/ml
- trizol (Invitrogen, ZDA)
- kloroform (Merck, Nemčija)
- izopropanol (Merck, Nemčija)
- 75 % etanol, pripravljen iz absolutnega etanola (Merck, Nemčija)
- demineralizirana in destilirana sterilna voda brez ribonukleazne aktivnosti (ddH₂O) (Promega, ZDA)

3.1.2.2 Komplet reagentov za osamitev RNK NucleoSpin[®] RNA Plant in RNA II (MACHEREY-NAGEL, Nemčija)

- pufer RA1 in RAP, pufer RA2, pufer RA3, pufer MDB, DNaza reakcijski pufer, DNaza I (MACHEREY-NAGEL, Nemčija)
- β - merkaptoetanol
- 70 % etanol, pripravljen iz absolutnega etanola (Merck, Nemčija)

3.1.2.3 Osamitev RNK z gvanidintiocianatom (GuSCN) in siliko

- suspenzija SiO₂
- 100 % aceton
- 3M natrijev acetat (pH 5,2)
- absolutni alkohol (Merck, Nemčija)
- 1M NaOH
- 1M NaCl
- pufer L2: 120 g gvanidintiocianat (GuSCN), 40 ml H₂O, 10 ml Tris – HCl (pH 6,4), H₂O do 171 ml
- pufer L6: 120 g gvanidintiocianat (GuSCN), 40 ml, 10 ml Tris – HCl (pH 6,4), 22 ml 0,2 M EDTA (pH 8,0), 2,6 ml TritonX-100, H₂O do 196 ml

3.1.3 Encimi in reagenti pri metodi RT-PCR, PCR in RT-PCR v realnem času

3.1.3.1 Reagenti za RT-PCR (Promega, ZDA)

- ddH₂O
- 5x PCR pufer
- mešanica dNTP, 10 mM vsakega
- raztopina MgSO₄, 25 mM
- AMV reverzna transkriptaza, 5 U/ μ l
- *Tfl* polimeraza DNK, 5 U/ μ l

3.1.3.2 Reagenti za PCR (Promega, ZDA)

- ddH₂O
- 10x PCR pufer
- mešanica dNTP, 10 mM
- raztopina MgCl₂, 50 mM
- *PlatTaq* polimeraza DNK, 5 U/μl

3.1.3.3 Reagenti za RT-PCR v realnem času SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR with ROX (Invitrogen, ZDA)

- ddH₂O
- 2x mešanica (0,4 mM dNTP, 6 mM MgSO₄, ROX)
- mešanica SS III reverzna transkriptaza in *PlatTaq* polimeraza DNK

3.1.4 Pufri in reagenti za elektroforezo v agaroznem gelu

6x nanašalni pufer

- bromfenol modro 0,25 % (ut/v)
- ksilen cianol 0,25 % (ut/v)
- saharoza v 5mM EDTA 40 % (ut/v)

Standard velikosti DNK (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, ZDA)

1x TAE pufer (delovna raztopina) pripravimo iz 50x TAE (založna raztopina)

- Tris baza 242,0 g
- EDTA 37,2 g
- očetna kislina 57,1 ml

Zmešamo Tris bazo in EDTA, dodamo ddH₂O do 850 ml, mešamo dokler se reagenta ne raztopita, dodamo očetno kislino in uravnamo pH na 8,5 ter dodamo ddH₂O do 1000 ml.

Etidijev bromid (0,5 µg/ml) delovna raztopina

- 50 ml etidijev bromid (10 mg/ml)
 - 500 mg etidijev bromid
 - 50 ml ddH₂O
- 1000 ml 1x TAE

1,8 % agarozni gel

- 1,8 g agaroze (Invitrogen, ZDA)
- 100 ml ddH₂O

Segrevamo do vrenja in premešamo. Postopek ponavljamo, dokler ne dobimo bистre raztopine, ki jo ohladimo do približno 60 °C in vlijemo v kadičko za elektroforezo. Vstavimo glavnik. Ko se agarosa strdi, odstranimo glavnik. Tako dobimo žepke, v katere nanašamo vzorce.

3.1.5 Laboratorijske aparature in drobna oprema

- ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, ZDA)
- termopomnoževalnik (GeneAmp[®] PCR System 2400, Perkin Elmer, ZDA)
- UV transiluminator (Biometra, Nemčija)
- videokamera (Bio Imaging System, GeneGenius, Syngene, ZDA)
- komora za sterilno delo
- centrifuga Biofuge 17RS (Heraeus, Nemčija)
- centrifuga Multifuge 1S-R (Heraeus, Nemčija)
- aparatura za elektroforezo (Biometra, Nemčija)
- napajalnik za elektroforezo (Biometra, Nemčija)
- mešalo vorteks (IKA Laboratories, Nemčija)
- eletromagnetno mešalo
- termoblok
- tehnica
- mikrovalovna pečica
- kombiniran hladilnik (4 °C ± 2 °C) z zamrzovalnikom (- 15 °C ± 5 °C)
- zamrzovalna skrinja (-70 °C ± 5°C)

- avtomatske pipete (Gilson, ZDA)
- nastavki s filtri za avtomatske pipete
- plastične epruvete (0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml)
- plastične epruvete s PLG (angl. Phase Locking gel), (Eppendorf, Nemčija)
- MicroAmp® ploščice s 96 jamicami (Applied Biosystems, ZDA)
- stojalo za epruvete
- skalpel
- pinceta
- plastične petrijevke
- merilni valji (100 ml, 1000 ml)
- erlenmajerica
- vedro
- steklenice za odpadni etanol, izopropanol in kloroform ter fenol
- zaščitne rokavice
- led

3.1.6 Začetni oligonukleotidi in sonde

Par začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I smo uporabili za detekcijo norovirusov GGI in GGII, par CapA/CapB2, G1SKF/G1SKR in G1/SM31 specifično za dokazovanje norovirusov GGI, G2SKF/G2SKR in G2/SM31 pa specifično za dokazovanje norovirusov GGII. Štiri notranje začetne oligonukleotide smo uporabili za dodatno pomnoževanje prvega produkta PCR. S parom Ando/E3 smo pomnoževali odsek znotraj produkta RT-PCR s parom G1/SM31. S parom NI/E3 pa smo dodatno pomnoževali produkt RT-PCR, ki smo ga dobili s parom G2/SM31. Pri reakciji RT-PCR v realnem času smo za dokazovanje norovirusov GGI uporabili začetna oligonukleotida JJVIF/JJVIR in sondo JJVI, ter NV1LCF/NV1LCR in sondo NVGGI. Za dokazovanje norovirusov GGII smo uporabili par COG2F/COG2R in sondo RING2. Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond so prikazana v preglednici 3-1.

Preglednica 3-1: Začetni oligonukleotidi in sonde

Začetni oligonukleotid	Tarčna GG	Nukleotidno zaporedje ^a 5'→ 3'	Polarnost	Mesto v genomu ^b	Tarčni del genoma ^c	Dolžina fragmenta	Vir
JV12Y	GGI in GGII	ATACCACTATGATGCAGAYTA	+	4552-4572 ^{GGI} 4279-4299 ^{GGII}	RdRp	327 bp	Vennema in sod., 2002; Boxman in sod., 2006
JV13I		TCATCATCACCATAGAAIGAG	-	4858-4878 ^{GGI} 4585-4605 ^{GGII}			
CapB2	GGI	TATGTTGACCTGATAC	+	6738-6754	kapsida	177 bp	Vinje in sod., 2004
CapA		GGCWGTTCCCACAGGCTT	-	6897-6914			
G1SKF	GGI	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	+	5342-5361	kapsida	369 bp	Kojima in sod., 2002
G1SKR		CCAACCCARCCATTRTACA	-	5653-5671			
G1	GGI	TCNGAAATGGATGTTGG	+	4679-4696	RdRp	190 bp	Green in sod., 1998
SM31		CGATTTTCATCATCACCATA	-	4871-4853			
Ando		GTGAACAGYATAAAAYCAYTGG	+	4766-4786		115 bp	Ando in sod., 1995 Green in sod., 1998
E3		ATCTCATCATCACCATA	-	4869-4853			
G2	GGII	AGCCNTNGAAATNATGGT	+	4338-4355	RdRp	270 bp	Green in sod., 1998
SM31		CGATTTTCATCATCACCATA	-	4607-4588			
NI		GAATTCCATCGCCCACTGGCT	+	4492-4512		114 bp	
E3		ATCTCATCATCACCATA	-	4605-4588			
G2SKF	GGII	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	+	5058-5076	kapsida	369 bp	Kojima in sod., 2002
G2SKR		CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	-	5379-5401			

a...enočrkovni zapis: B namesto G, T ali C; N namesto A, C, G ali T; R namesto A ali G; Y namesto C ali T; W namesto A ali T; I je iozin.

b...štetje po genomu virusa Norwalk (M87661) za noroviruse GGI in štetje po genomu virusa Lordsdale (X86557) za noroviruse GGII.

c...štetje po genomu virusa Camberwell (AF145896).

d...RdRp – polimerazni del genoma; kapsida – kapsidni del genoma; RdRp/kapsida - mesto, kjer se združita polimerazni in kapsidni del genoma.

Nadaljevanje preglednice 3-1: Začetni oligonukleotidi in sonde

Začetni oligonukleotid	Tarčna GG	Nukleotidno zaporedje ^a 5'→ 3'	Polarnost	Mesto v genomu ^b	Tarčni del genoma ^d	Dolžina fragmenta	Vir
JJVIF	GGI	GCCATGTTCCGITGGATG	+	5282-5299	RdRp/	96 bp	Jothikumar in sod., 2005
JJVIR		TCCTTAGACGCCATCATCAT	-	5377-5358	kapsida		
JJVI-pr		TGTGGACAGGAGATCGCAATCTC	+	5319-5341			
NV1LCF	GGI	CARGCCATGTTYCGYTGGATG	+	5279-5299	kapsida	98 bp	Svraka in sod., 2007
NV1LCR		CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	-	5354-5376			
NVGGI-pr		ATTCGGGCAGGAGAT	+	5321-5335			
COG2F	GGII	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	5003-5028 ^c	RdRp/	98 bp	Kageyama in sod., 2003
COG2R		TCGACGCCATCTTCATTCACA	-	5100-5080 ^c	kapsida		
RING2-pr		TGGGAGGGCGATCGCAATCT	+	5048-5067 ^c			

a...enočrkovni zapis: B namesto G, T ali C; N namesto A, C, G ali T; R namesto A ali G; Y namesto C ali T; W namesto A ali T; I je iozin.

b...štetje po genomu virusa Norwalk (M87661) za noroviruse GGI in štetje po genomu virusa Lordsdale (X86557) za noroviruse GGII.

c...štetje po genomu virusa Camberwell (AF145896).

d...RdRp – polimerazni del genoma; kapsida – kapsidni del genoma; RdRp/kapsida - mesto, kjer se združita polimerazni in kapsidni del genoma.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Umetna okužba školjk

V dve vedri s 5 litri morske vode smo dali dvanajst dagnj. V eno vedro smo dali 1 ml suspenzije iztrebka z dokazano okužbo z norovirusom GGII. Po pet školjk smo pobrali iz obeh veder po štiriindvajsetih in osemindvajsetih urah.

3.2.2 Priprava hepatopankreasov školjk za izolacijo RNK

Školjke smo odprli tako, da smo s skalpelom prerezali mišico zapiralko. Izrezali smo hepatopankrease in jih v plastičnih petrijevkah čimbolj homogenizirali. Za pozitivno kontrolo smo dodali 50 μ l suspenzije iztrebka z dokazano okužbo z norovirusi GGI oziroma GGII. Alikvote po 750 μ l smo prenesli v plastične epruvete (1,5 ml), dodali 750 μ l proteinaze K (100 μ g/ml) in vorteksirali. Po stresanju 1 uro pri 37 °C smo inaktivirali proteinazo K 15 minut pri 65 °C. Centrifugirali smo 5 minut pri 3000 g. Supernatant, ki ga nismo porabili za izolacijo RNK, smo shranili pri -70 °C.

3.2.3 Izolacija RNK

RNK smo izolirali v prostoru, ločenem od prostorov, namenjenih pripravi reakcijskih mešanic za PCR in detekcijo produktov PCR. Pri delu smo uporabljali rokavice in jih redno menjali. Uporabljali smo nastavke in epruvete brez RNaz. Da smo preprečili kontaminacijo med vzorci, smo uporabljali nastavke s filtri.

3.2.3.1 Metoda z reagentom TRIZOL (Invitrogen, ZDA)

Zmešali smo 250 μ l vzorca in 750 μ l reagenta Trizol, dobro suspendirali s pipetiranjem in inkubirali na sobni temperaturi 5 minut. Dodali smo 200 μ l kloroforma in dobro premešali (vorteks). Po 5 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo centrifugirali 15 minut pri 14000 obratih na minuto in 4 °C. Zgornjo fazo (prozorna, vodna faza, ki vsebuje RNK) smo prenesli v novo epruveto in dodali 500 μ l izopropanola, dobro premešali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi ter centrifugirali najmanj 10 minut pri 14000 obratih na

minuto in 4 °C. Odlili smo supernatant in RNK sprali s 75 % etanolom (-20 °C), dobro premešali (vorteks) in centrifugirali 5 minut pri 10000 obratih na minuto in 4 °C. Odlili smo supernatant in RNK posušili na zraku v komori za sterilno delo pri maksimalnem pretoku zraka. RNK smo raztopili v ddH₂O in shranili pri -70 °C, ker RNK, raztopljena v vodi, ni stabilna.

Metodo smo uporabljali za izolacijo RNK iz vzorcev iztrebkov in vzorcev referenčnega laboratorija.

3.2.3.2 Metoda z reagentom TRIZOL (Invitrogen, ZDA) in PLG (Eppendorf, Nemčija)

Epruvete s PLG smo centrifugirali 20 – 30 sekund pri 12300 obratih na minuto, da se je PLG usedel na dno.

V drugi epruveti smo zmešali 100 µl vzorca in 750 µl Trizola, dobro suspendirali s pipetiranjem in inkubirali na sobni temperaturi 5 minut. Dodali smo 200 µl kloroforma, dobro premešali (vorteks) in prenesli v epruvete s PLG. Po 5 – minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo centrifugirali 15 minut pri 14000 obratih na minuto in 4 °C. Zgornjo fazo (prozorna, vodna faza, ki vsebuje RNK) smo prenesli v novo epruveto in dodali 500 µl izopropanola, dobro premešali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi ter centrifugirali najmanj 10 minut pri 14000 obratih na minuto in 4 °C. Odlili smo supernatant in RNK sprali s 75 % etanolom (-20 °C), dobro premešali (vorteks) in centrifugirali 5 minut pri 10000 obratih na minuto in 4 °C. Odlili smo supernatant in RNK posušili na zraku v komori za sterilno delo pri maksimalnem pretoku zraka. RNK smo raztopili v ddH₂O in shranili pri -70 °C, ker RNK, raztopljena v vodi, ni stabilna.

Metodo smo uporabljali za izolacijo RNK iz vzorcev školjk.

3.2.3.3 Metoda s kompletom NucleoSpin® RNA Plant (MACHEREY-NAGEL, Nemčija)

100 µl vzorca smo dodali 350 µl pufra RAP in 3,5 µl β-merkptoetanolu ter dobro premešali (vorteks). Lizat smo prenesli v filtrirno enoto NucleoSpin® in centrifugirali 1 minuto pri 11000 g. Supernatant smo prenesli v novo epruveto, dodali 350 µl 70 % etanola in dobro premešali ter prenesli na kolono NucleoSpin® RNA Plant ter centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Na kolono smo nanesli 350 µl pufra MDB in centrifugirali 1 minuto pri 11000 g (odstranitev soli poveča učinkovitost DNaze I). Nato smo nanesli 95 µl DNaze reakcijske mešanice (10 µl DNaze I in 90 µl DNaza reakcijskega pufra) in inkubirali pri

sobni temperaturi 15 minut. Po inkubaciji smo nanegli 200 μ l pufra RA2, ki inaktivira DNazo, centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Kolono smo prenesli v novo epruveto in nanegli 600 μ l pufra RA3 ter centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Filtrat smo zavrgli in kolono ponovno sprali s 250 μ l pufra RA3 in centrifugirali 2 minuti pri 11000 g. Kolono smo prenesli v novo epruveto, eluirali RNK s 50 μ l ddH₂O in centrifugirali 1 minuto pri 11000 g. V vodi raztopljeno RNK smo shranili pri -70 °C.

3.2.3.4 Metoda s kompletom NucleoSpin[®] RNA II (MACHEREY-NAGEL, Nemčija)

100 μ l vzorca smo dodali 350 μ l pufra RA1 in 3,5 μ l β -merkptoetanolu ter dobro premešali (vorteks). Lizat smo prenesli v filtrirno enoto NucleoSpin[®] in centrifugirali 1 minuto pri 11000 g. Supernatant smo prenesli v novo epruveto, dodali 350 μ l 70 % etanola in dobro premešali in prenesli na kolono NucleoSpin[®] RNA II ter centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Na kolono smo nanegli 350 μ l pufra MDB in centrifugirali 1 minuto pri 11000 g (odstranitev soli poveča učinkovitost DNaze I). Nato smo nanegli 95 μ l DNazne reakcijske mešanice (10 μ l DNaze I in 90 μ l DNaza reakcijskega pufra) in inkubirali pri sobni temperaturi 15 minut. Po inkubaciji smo nanegli 200 μ l pufra RA2, ki inaktivira DNazo, centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Kolono smo prenesli v novo epruveto in nanegli 600 μ l pufra RA3 ter centrifugirali 30 sekund pri 8000 g. Filtrat smo zavrgli in kolono ponovno sprali s 250 μ l pufra RA3 in centrifugirali 2 minuti pri 11000 g. Kolono smo prenesli v novo epruveto, eluirali RNK s 50 μ l ddH₂O in centrifugirali 1 minuto pri 11000 g. V vodi raztopljeno RNK smo shranili pri -70 °C.

3.2.3.5 Metoda z GuSCN in siliko

V epruveto s 10 μ l suspenzije SiO₂ smo dodali 900 μ l pufra L6 in 100 μ l vzorca ter dobro premešali (vorteks) 20 sekund. Po 20 – minutni inkubaciji pri sobni temperaturi in obračanjem vsakih 10 sekund smo centrifugirali 50 sekund pri 16000 g ter odstranili supernatant. Dodali smo 1 ml pufra L2, dobro premešali (vorteks), centrifugirali 50 sekund pri 16000 g in odstranili supernatant ter postopek ponovili. Nato smo dodali 1 ml 70 % etanola (< -15 °C), dobro premešali (vorteks), centrifugirali 50 sekund pri 16000 g in odstranili supernatant. Dodali smo 1 ml 100 % acetona, centrifugirali 50 sekund pri 16000 g. Odstranili smo ves supernatant in po potrebi sušili na zraku v komori za sterilno delo, da smo odstranili vse vidne sledi topila. Nato smo dodali 52,5 μ l ddH₂O, dobro premešali

(vorteks) in centrifugirali 140 sekund pri 16000 g. Vsaj 50 μ l supernatanta smo prenesli v epruveto s 5 μ l 3 M natrijevega acetata in 110 μ l 100 % etanola (< -15 °C) ter dobro premešali (vorteks). Po 30 – minutni do 2 – urni inkubaciji pri < -65 °C smo centrifugirali 20 minut pri 22000 g in 4 °C. Odstranili smo ves supernatant in RNK posušili na zraku v komori za sterilno delo pri maksimalnem pretoku zraka. RNK smo raztopili v 50 μ l ddH₂O in shranili pri -70 °C.

3.2.4 Hkratna reakcija reverzne transkripcije in pomnoževanja z zunanjimi začetnimi oligonukleotidi (RT-PCR)

Za reakcijo smo uporabljali reagente in encime proizvajalca Promega Access RT-PCR ter upoštevali priložena navodila.

Za vse vzorce smo pripravili reakcijsko mešanico v 1,5 ml epruveti. Za vsak vzorec smo dali reakcijske komponente, prikazane v preglednici 3-2.

Preglednica 3-2: Reakcijska mešanica za RT-PCR (Promega, Access RT-PCR, 2006).

Reakcijska komponenta	Koncentracija	Volumen (μ l)	Končna koncentracija (v 50 μ l)
ddH ₂ O		28,0	
5xPCR pufer		10,0	
dNTP mešanica	10 mM	1,0	0,2 mM
Začetni oligonukleotid 1	20 mM	1,0	0,4 mM
MgSO ₄	25 mM	2,0	1 mM
RT AMV	5 U/ μ l	1,0	0,1 U/ μ l
DNK polimeraza Tfl	5 U/ μ l	1,0	0,1 U/ μ l

V 0,2 ml epruvete smo pripravili 5 μ l izolirane RNK in dodali po 1 μ l začetnega oligonukleotida 2 ter inkubirali 5 minut pri 94 °C (denaturacija RNK).

Epruvete smo prestavili na led in dodali po 44 μ l reakcijske mešanice ter vstavili v termopomnoževalnik in vklopili program (Preglednica 3-3).

Preglednica 3-3: Pogoji za RT-PCR

Proces	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Reverzna transkripcija	42	45 sekund	1
Razdvajanje	94	2 minuti	1
Razdvajanje	94	30 sekund	40
Vezava začetnih oligonukleotidov	Odvisno od začetnih oligonukleotidov*	1 minuta	
Podaljševanje	68	2 minuti	
Končna inkubacija	68	7 minut	1
Ohlajevanje	4	∞	

* 45 °C G1SKF/G1SKR; 37 °C G1/SM31, G2/SM31, JV12Y/JV13I; 48 °C G2SKF/G2SKR

Produkte RT-PCR smo shranili pri -20 °C.

3.2.5 PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi

Za vse vzorce (RT-PCR produkt) smo pripravili reakcijsko mešanico v 1,5 ml epruveti. Za vsak vzorec smo dali reakcijske komponente, prikazane v preglednici 3-4

Preglednica 3-4: Reakcijska mešanica za PCR

Reakcijska komponenta	Koncentracija	Volumen (μl)	Končna koncentracija (v 50 μl)
ddH ₂ O		38,0	
10xPCR pufer		5,0	
dNTP mešanica	10 mM	1,0	0,2 mM
Začetni oligonukleotid 1	20 mM	1,0	0,4 mM
Začetni oligonukleotid 2	20mM	1,0	0,4 mM
MgCl ₂	50 mM	1,5	1,5 mM
PlafTaq DNK pol.	5 U/μl	0,5	0,05 U/μl

V 0,2 ml epruvete smo dali 1 μ l DNK iz ustrezne RT-PCR in dodali 49 μ l reakcijske mešanice ter vstavili v termopomnoževalnik in vklopili program (Preglednica 3-5).

Preglednica 3-5: Pogoji za PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi

Proces	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Čas	Število ciklov
Razdvajanje	94	2 minuti	1
Razdvajanje	94	30 sekund	35
Vezava začetnih oligonukleotidov	37	30 sekund	
Podaljševanje	72	1 minuta	
Končna inkubacija	72	7 minut	1
Ohlajevanje	4	∞	

Produkte PCR smo shranili pri -20° C.

3.2.6 Analiza produktov RT-PCR in PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Za pripravo 1,8 % agaroznega gela smo zatehtali ustrezno količino agaroze v prahu in dodali ustrezen volumen 1X TAE pufru. Suspenzijo smo zavreli v mikrovalovni pečici, premešali in postopek ponovili, dokler nismo dobili bistre raztopine. Agarozo smo ohladili do 60° C, vlili v kadičko za pripravo gelov, odstranili morebitne zračne mehurčke, ki bi vplivali na potovanje vzorcev in vstavili glavnik. Ko je gel polimeriziral, smo ga prenesli v kadičko za elektroforezo, po potrebi dolili 1X TAE pufer, da je bil ves gel v pufru ter previdno odstranili glavnik.

15 μ l produkta RT-PCR ali PCR smo zmešali s 3 μ l nanašalnega pufru in nanесли v žepke. V en žepok smo nanесли 2 μ l molekularnega označevalca DNK (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas, ZDA).

Elektroforeza je potekala približno 50 minut pri 100 mA. DNK v gelu smo po končani elektroforezi obarvali z raztopino etidijevega bromida in nevezan etidijev bromid sprali z vodo. Gel smo pogledali z UV transiluminatorjem, posneli s kamero in posnetek obdelali z računalniškim programom.

3.2.7 Hkratna reakcija reverzne transkripcije in pomnoževanja z zunanjimi začetnimi oligonukleotidi v realnem času (Real Time RT-PCR)

Za reakcijo smo uporabljali reagente in encime proizvajalca Invitrogen ter upoštevali priložena navodila.

Za vse vzorce smo pripravili reakcijsko mešanico v 1,5 ml epruveti. Za vsak vzorec smo dali reakcijske komponente, prikazane v preglednici 3-6.

Preglednica 3-6: Reakcijska mešanica za RT-PCR v realnem času

Reakcijska komponenta	Koncentracija	Volumen (μ l)	Končna koncentracija (v 25 μ l)
ddH ₂ O		4,5	
2x MIX (0,4 mM dNTP, 6 mM MgSO ₄) z ROX		12,5	
Začetni oligonukleotid 1	20 mM	1,0	0,8 mM
Začetni oligonukleotid 2	20 mM	1,0	0,8 mM
Sonda*	5 mM	1,5	0,3 mM
SS III RT/PlatTaq MIX		0,5	

V optično mikroploščico s 96 jamicami smo pripravili 4 μ l izolirane RNK in 4 μ l 10 – kratne redčitve izolirane RNK v dveh paralelkah in dodali k vsakemu vzorcu po 21 μ l reakcijske mešanice. Celoten postopek smo opravili na ledu. Ploščico smo pokrili z optično folijo (MicroAmp™ Optical Adhesive Film) in centrifugirali nekaj sekund pri 4000 obratih na minuto in 4 °C. Ploščico smo nato vstavili v termopomnoževalnik ABIPRISM 7000 (Applied Biosystems, ZDA), pokrili s kompresijsko blazinico (MicroAmp™ Optical Film Compression Pad), zaprli aparaturo in vklopili program (Preglednica 3-7) z računalnikom s programsko opremo (ABI Prism7000 SDS Software, Applied Biosystems).

Preglednica 3-7: Pogoji za RT-PCR v realnem času

Proces	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Reverzna transkripcija	50	15 minut	1
Razdvajanje	95	2 minuti	1
Razdvajanje	95	15 sekund	45
Vezava začetnih oligonukleotidov in podaljševanje	60	30 sekund	

4 REZULTATI

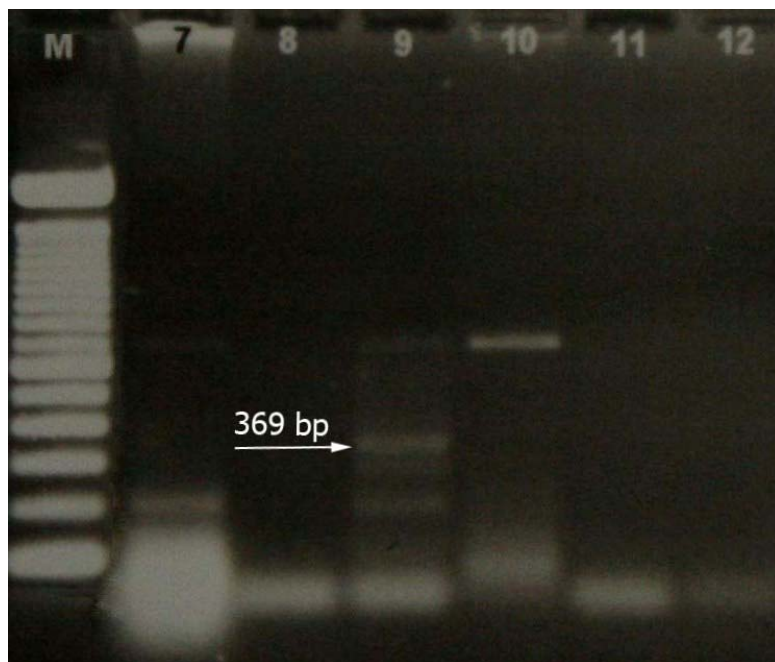
4.1 DOKAZOVANJE NOROVIRUSOV S KLASIČNO METODO RT-PCR

4.1.1 Pregled vzorcev iz referenčnega laboratorija Evropske unije

Vzorci so vsebovali noroviruse genske skupine I ali II, noroviruse obeh skupin ali pa so bili negativni glede norovirusov.

Iz vzorcev tihomorskih ostrig BM1 in BM2 smo RNK izolirali z reagentom Trizol in PLG, z metodo NucleoSpin[®] RNA Plant in z metodo GuSCN/silika. Iz vzorcev supernatantov A – F smo RNK izolirali z reagentom Trizol.

Pri klasični metodi RT-PCR smo določali noroviruse GGI s parom začetnih oligonukleotidov G1SKF/G1SKR (Slika 4-1). Pozitiven rezultat (PCR produkt velikosti 369 bp) smo dobili pri vzorcu BM1 po izolaciji RNK z metodo NucleoSpin[®] RNA Plant (Slika 4-1, kolona 9) in pri vzorcu C (Slika 4-3, kolona 3 levo). Pri izolaciji RNK z reagentom Trizol smo dobili le nespecifične produkte (Slika 4-1, koloni 7 in 10). Pri vzorcih A – F nismo dobili pozitivnega rezultata (ni prikazano).



Slika 4-1: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol/PLG, z metodo GuSCN/silika ter z metodo NucleoSpin® RNA Plant. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov G1SKF/G1SKR.

Legenda:

M: molekularni označevalec DNK (100 bp)

7: BM1 – RNK, izolirana z reagentom Trizol/PLG

8: BM1 – RNK, izolirana z metodo GuSCN/silika

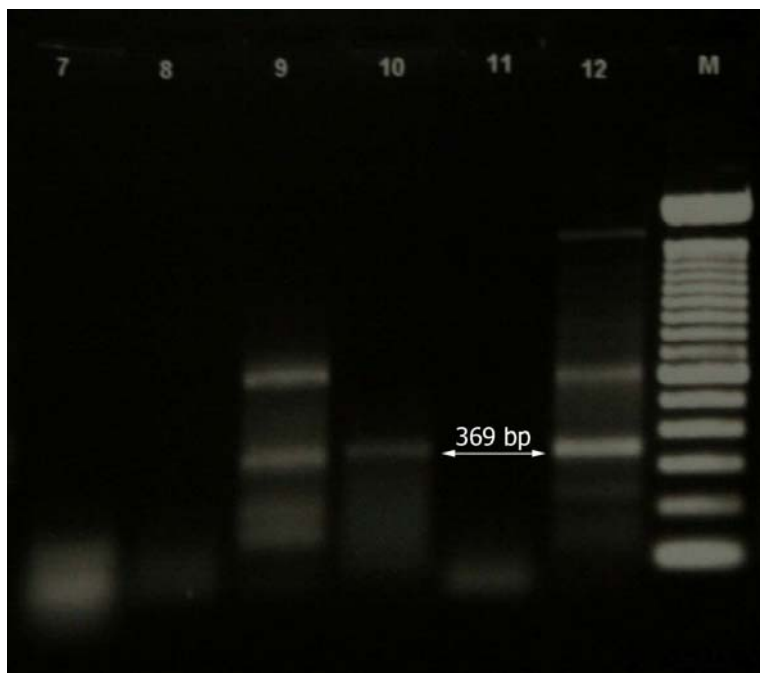
9: BM1 – RNK, izolirana z metodo NucleoSpin® RNA Plant

10: BM2 – RNK, izolirana z reagentom Trizol/PLG

11: BM2 – RNK, izolirana z metodo GuSCN in siliko

12: BM2 – RNK, izolirana z metodo NucleoSpin® RNA Plant

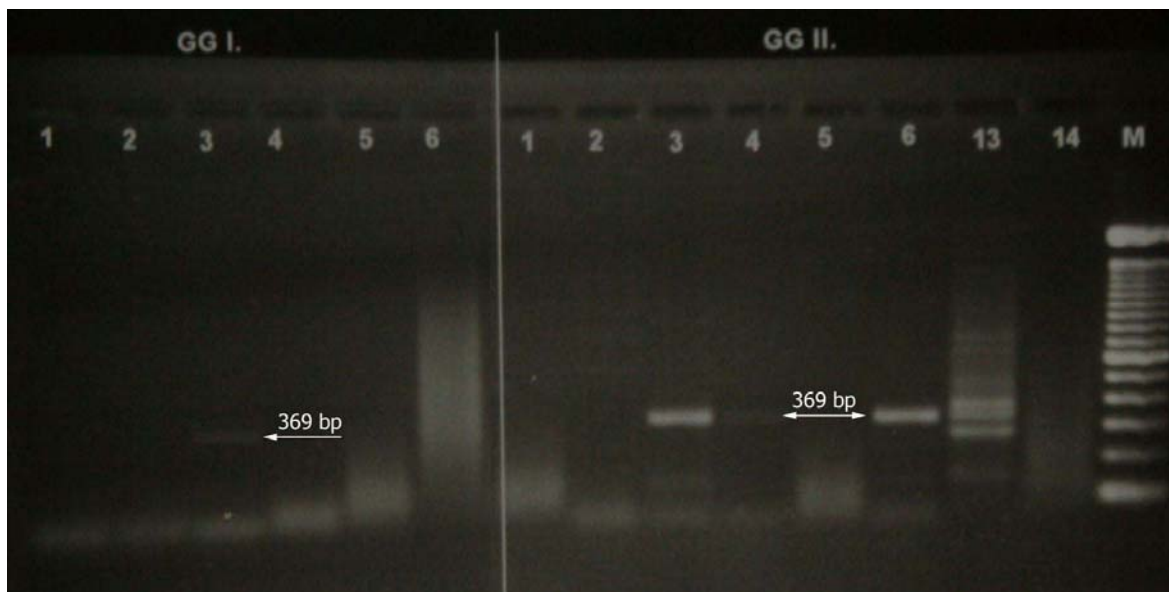
Za določanje norovirusov GGII z metodo RT-PCR smo uporabili par začetnih oligonukleotidov G2SKF/G2SKR (Slika 4-2 in 4-3 levo). Pozitiven rezultat (PCR produkt velikosti 369 bp) smo dobili pri vzorcu školjk BM2 po izolaciji RNK z reagentom Trizol (Slika 4-2, kolona 10) in pri izolaciji RNK s kompletom NucleoSpin® RNA Plant (Slika 4-2, kolona 12) ter pri vzorcu školjk BM1 po izolaciji RNK s kompletom NucleoSpin® RNA Plant (Slika 4-2, kolona 9). Pozitivne rezultate smo dobili tudi pri vzorcih C, D in F ter vzorcu iztrebka 915/05 z dokazano navzočnostjo GGII, ki smo ga uporabili za pozitivno kontrolo (Slika 4-3, kolone 3, 4, 6 levo in 13).



Slika 4-2: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol/PLG, z metodo GuSCN/silika ter z metodo NucleoSpin[®] RNA Plant. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov G2SKF/G2SKR.

Legenda:

- 7: BM1 – RNK, izolirana z reagentom Trizol/PLG
- 8: BM1 – RNK, izolirana z metodo GuSCN/silika
- 9: BM1 – RNK, izolirana z metodo NucleoSpin[®] RNA Plant
- 10: BM2 – RNK, izolirana z reagentom Trizol/PLG
- 11: BM2 – RNK, izolirana z metodo GuSCN in siliko
- 12: BM2 – RNK, izolirana z metodo NucleoSpin[®] RNA Plant
- M: molekularni označevalec DNK (100 bp)



Slika 4-3: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov G1SKF/G1SKR (levo) in G2SKF/G2SKR (desno).

Legenda:

1: A

2: B

3: C

4: D

5: E

6: F

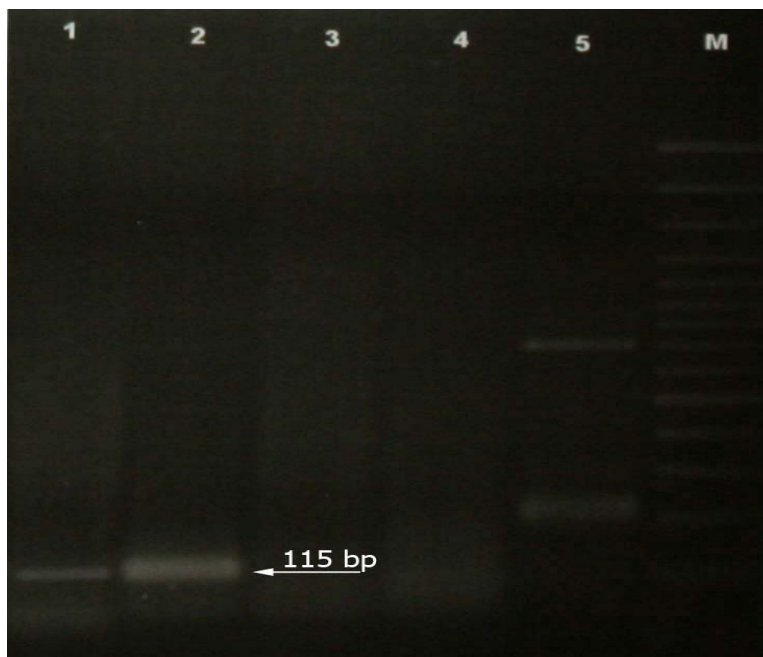
13: vzorec iztrebka (915/05)

14: negativna kontrola

M: molekularni označevalec DNK (100 bp)

Na vzorcih referenčnega laboratorija smo preverili občutljivost in specifičnost začetnih oligonukleotidov G1/SM31 in notranjih začetnih oligonukleotidov Ando/E3, specifičnih za noroviruse GGI ter para G2/SM31 in notranjih začetnih oligonukleotidov NI/E3, specifičnih za noroviruse GGII.

S parom G1/SM31 nismo dobili pozitivnega rezultata. Po RT-PCR (G1/SM31) smo izvedli PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi Ando/E3 (Slika 4-4). Pozitiven rezultat (produkt PCR velikosti 115 bp) smo dobili pri vzorcih supernatantov C in F (Slika 4-4, koloni 1 in 2). Pri vzorcu supernatanta D smo dobili le nespecifične produkte (Slika 4-4, kolona 5).



Slika 4-4: Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR. PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov Ando/E3

Legenda:

1: C

2: F

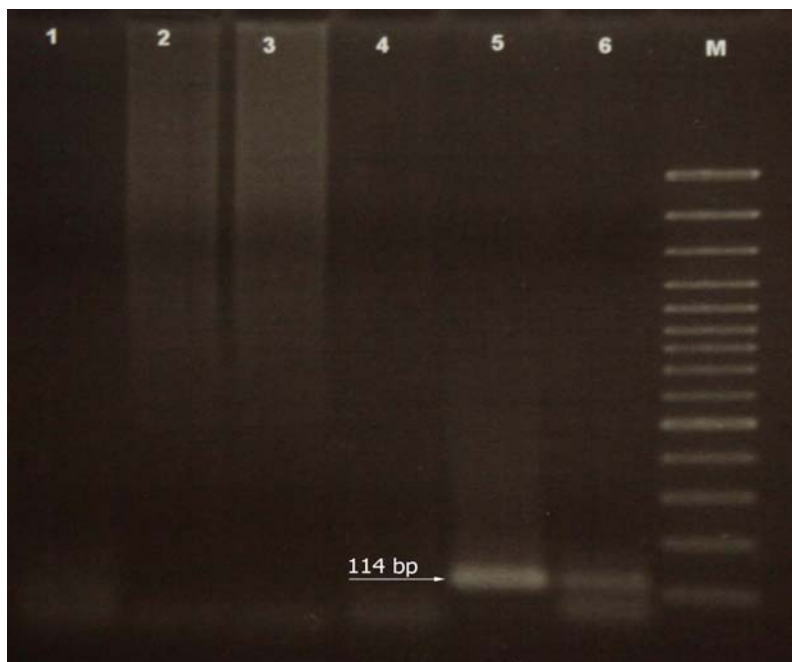
3: BM1

4: BM2

5: D

M: molekularni označevalec DNK (100 bp)

Pri reakciji RT-PCR z začetnimi oligonukleotidi G2/SM31 nismo dobili pozitivnega rezultata. Izvedli smo še PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi NI/E3 in dobili pozitiven rezultat (PCR produkt velikosti 114 bp) pri vzorcu BM1 in pri vzorcu iztrebka 915/05 z dokazano navzočnostjo GGII (Slika 4-5, koloni 5 in 6).



Slika 4-5: Agarozna gelska elektroforeza produktov PCR. Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov NI/E3

Legenda:

1: C

2: D

3: F

4: BM1

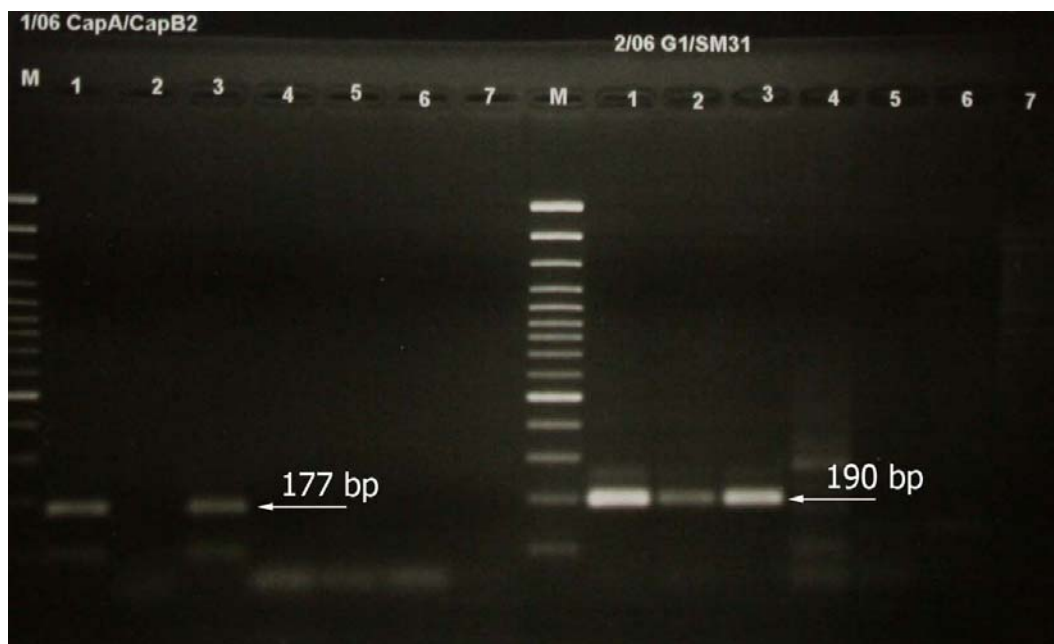
5: BM2

6: vzorec iztrebka 914/05

M: molekularni označevalec DNK (100 bp)

4.1.2 Dokazovanje norovirusov GGI v vzorcih iztrebkov

Na vzorcih iztrebkov (1998/04 in 2028/05) smo primerjali specifičnost in občutljivost začetnih oligonukleotidov CapA/CapB2 (Slika 4-6 levo) in G1/SM31 (Slika 4-6 desno). Pri RT-PCR s CapA/CapB2 smo dobili pozitiven rezultat (produkt velikosti 177 bp) pri vzorcu 1998/04 in njegovi 100 – kratni redčitvi (Slika 4-6, koloni 1 in 3 levo). Pri reakciji z G1/SM31 smo dobili pozitiven rezultat (produkt velikosti 190 bp) pri vzorcu 1998/04 in njegovi 10 – kratni in 100 – kratni redčitvi (Slika 4-6, kolone 1, 2 in 3 desno). Pri vzorcu 2028/05 smo dobili le več nespecifičnih produktov (Slika 4-6, kolona 4 desno).



Slika 4-6: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z reagentom Trizol. Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov CapA/CapB (levo) in par G1/SM31 (desno)

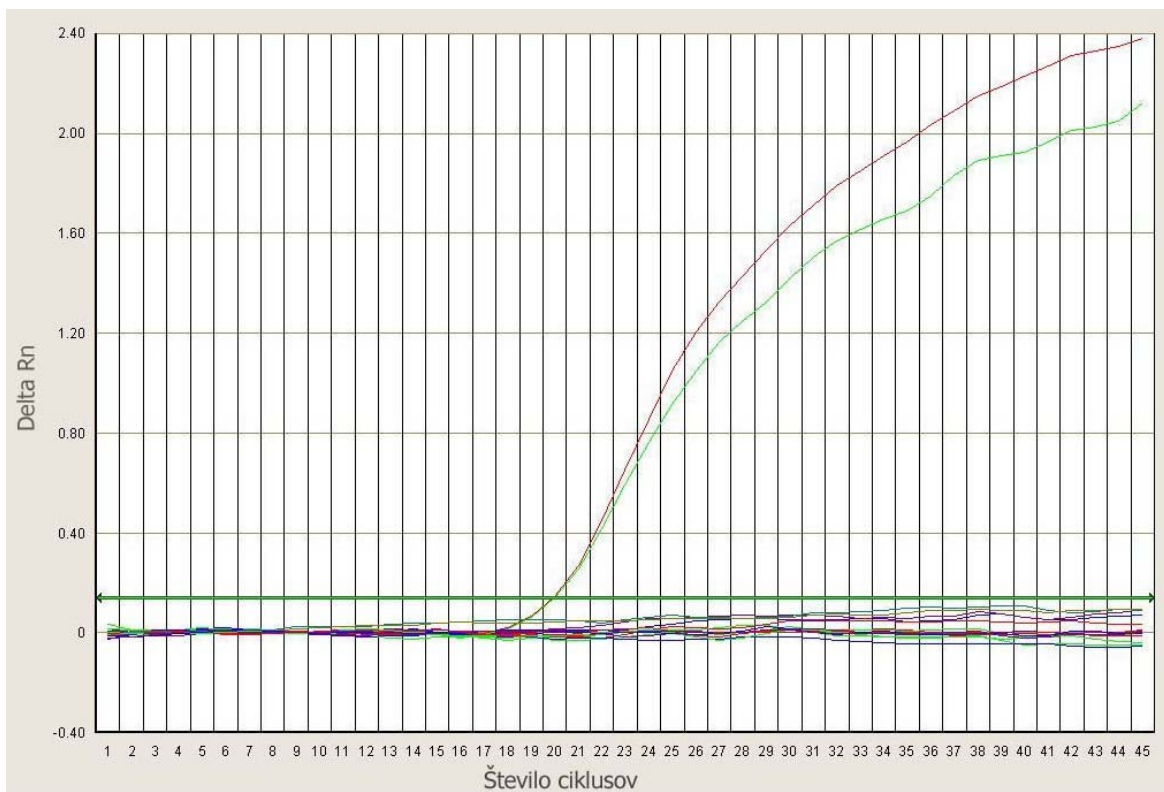
Legenda:

1. RNK, izolirana iz vzorca iztrebka 1998/04
 2. 10 – kratna redčitev RNK, izolirane iz vzorca iztrebka 1998/04
 3. 100 – kratna redčitev RNK, izolirane iz vzorca iztrebka 1998/04
 4. RNK, izolirana iz vzorca iztrebka 2028/05
 5. 10 – kratna redčitev RNK, izolirane iz vzorca iztrebka 2028/05
 6. 100 – kratna redčitev RNK, izolirane iz vzorca iztrebka 2028/05
 7. negativna kontrola
- M: molekularni označevalec DNK (100 bp)

4.2. REZULTATI DOLOČANJA NOROVIRUSOV Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU

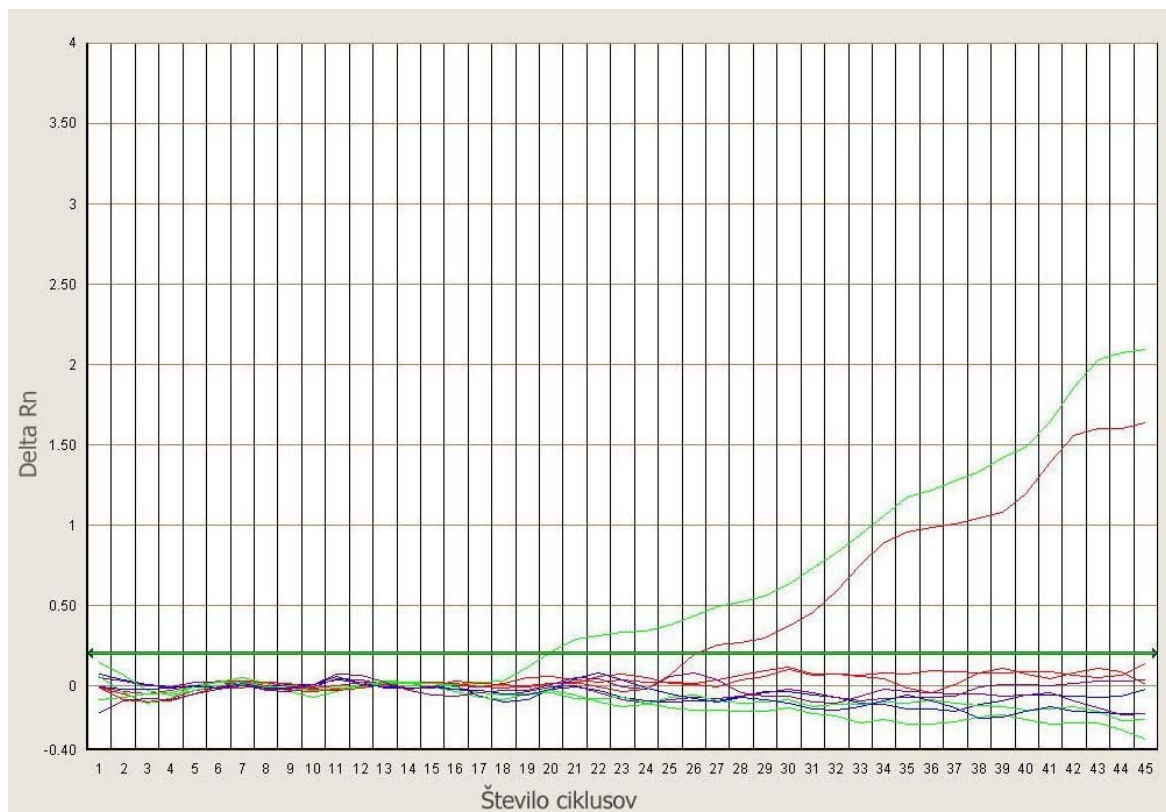
4.2.1 Dokazovanje norovirusov genske skupine I z metodo RT-PCR v realnem času

Pri metodi RT-PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi JJVIF/JVIR in sondo TaqMan JJVI pri vzorcih referenčnega laboratorija in vzorcu iztrebka (1998/04) z dokazanimi norovirusi GGI, ki smo jo uspešno potrdili s začetnimi oligonukleotidi CapA/CapB2 in G1/SM31 (Slika 4-6) nismo dobili pozitivnega rezultata. Pozitiven rezultat z značilno disociacijsko krivuljo (Slika 4-7) smo dobili le pri 100 – kratni redčitevi RNK, izolirane iz vzorca 2299/04. Bazno linijo smo dobili pri 0,137827 in vrednosti C_t 19, 93 in 20,00 za posamezno paralelko.



Slika 4-7: Pomnoževalni diagram v linearni obliki pri RT-PCR v realnem času s sondo TaqMan JJVI za 100 – kratno redčitev RNK izolirane iz vzorca 2299/04.

Metodo RT-PCR v realnem času smo izvedli tudi z začetnimi oligonukleotidi NV1LCF/NV1LCR in sondo TaqMan NVGGI. Pri vzorcu 1998/04 smo dobili neznačilno disociacijsko krivuljo (Slika 4-8). Bazno linijo smo ročno nastavili na 0,204283 in dobili vrednosti C_t 26,16 in 19,97 za posamezno paralelko.



Slika 4-8: Pomnoževalni diagram v linearni obliki pri RT-PCR v realnem času s sondo TaqMan NVGGI za RNK izolirano iz vzorca 1998/04 z reagentom Trizol.

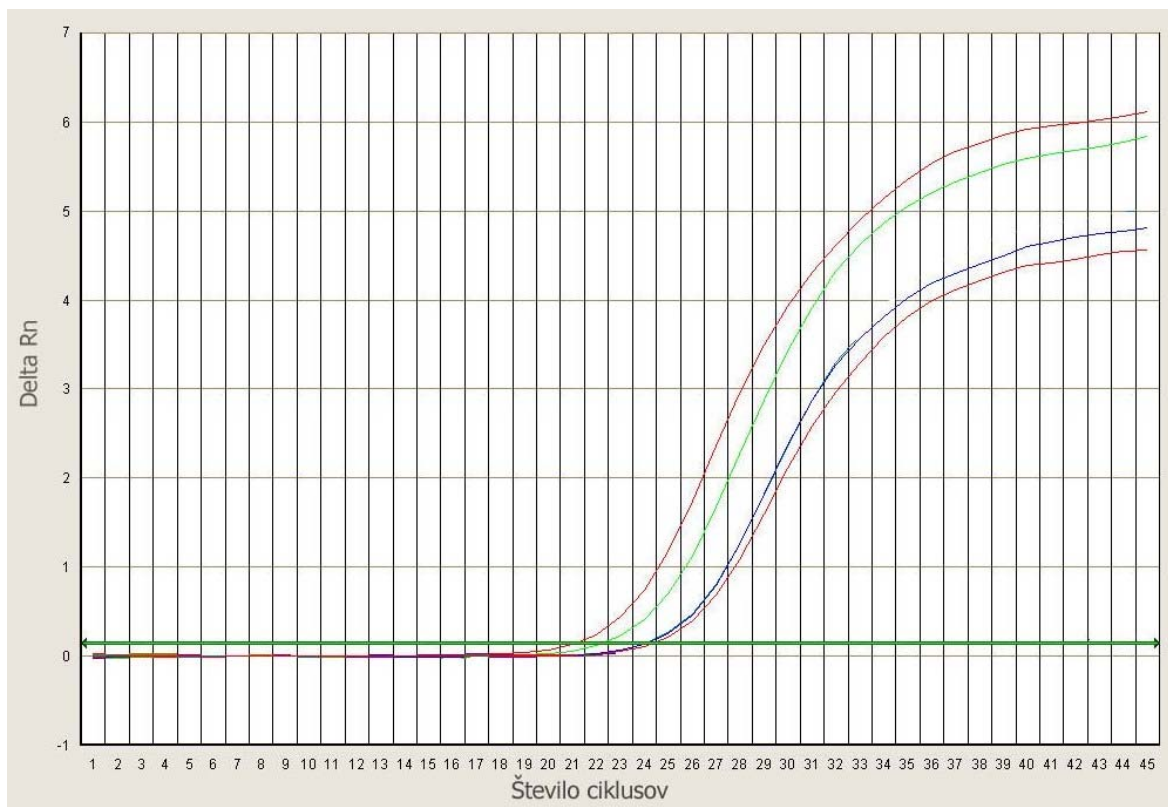
4.2.2 Dokazovanje norovirusov genske skupine II z metodo RT-PCR v realnem času

Z uporabo začetnih oligonukleotidov COG2F/COG2R in sonde TaqMan RING2 smo uspešno dokazali noroviruse GGII v treh vzorcih iztrebkov in vzorcu BM2 (Preglednica 4-1).

Preglednica 4-1: Vzorci in vrednosti Ct pri RT-PCR v realnem času z COG2F/COG2R in sondo TaqMan RING2

Vzorec	Ct
2028/05	21,16
	22,24
2028/05 10 – kratna redčitev izolirane RNK	24,08
	24,34
905/05	25,06
	24,17
905/05 10 – kratna redčitev izolirane RNK	28,04
	29,61
915/05	24,64
	24,64
915/05 10 – kratna redčitev izolirane RNK	28,31
	29,00
BM2	37,51
	35,42

Najnižje vrednosti Ct smo dobili pri vzorcu 2028/05 (Slika 4-9).



Slika 4-9: Pomnoževalni diagram v linearni obliki pri RT-PCR v realnem času s sondo TaqMan RING2 za RNK izolirano iz vzorca 2028/05 z reagentom Trizol.

4.3 Pregled umetno okuženih školjk

RNK smo iz hepatopankreasov školjk, umetno okuženih z norovirusi genske skupine GGII, izolirali z reagentom s Trizol in PLG. Za določitev norovirusov smo pri metodi RT-PCR uporabili par začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I. Pozitiven rezultat (produkt velikosti 327 bp) smo dobili le pri pozitivni kontroli (Slika 4-10, kolona 915/05)



Slika 4-10: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo izolirali iz vzorcev z reagentom Trizol/PLG. RT-PCR smo izvajali s parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I.

Legenda:

T1-N: 0,1 g hepatopankreasa po 24 h v okuženi morski vodi

T2-N: 0,5 g hepatopankreasa po 24 h v okuženi morski vodi

T3-N: 0,1 g hepatopankreasa po 48 h v okuženi morski vodi

T4-N: 0,5 g hepatopankreasa po 48 h v okuženi morski vodi

T5-NK: 0,1 g hepatopankreasa po 24 h v okuženi morski vodi

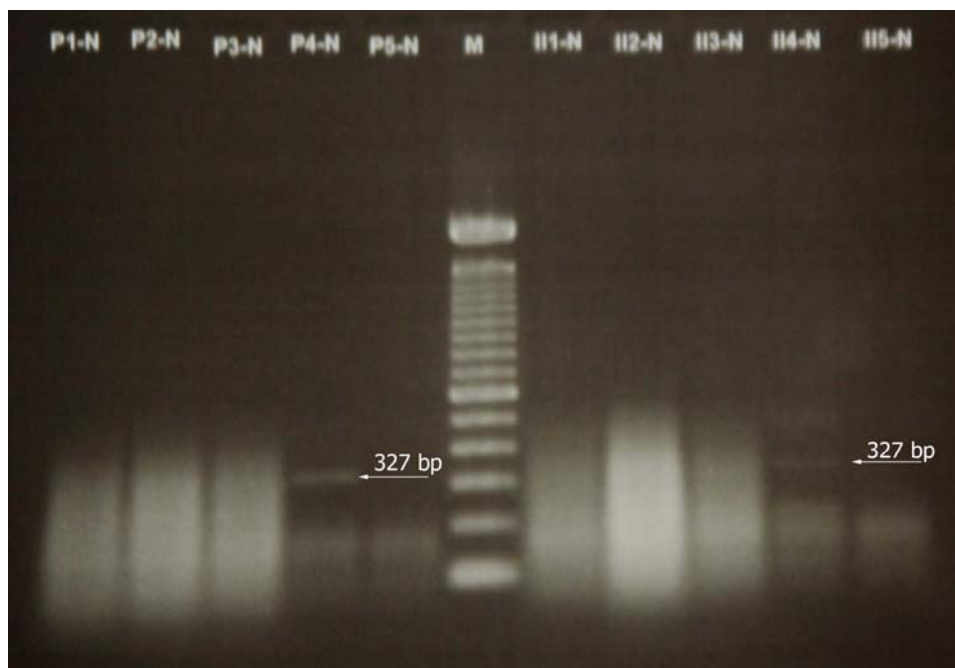
T5-NK: 0,5 g hepatopankreasa po 24 h v neokuženi morski vodi

915/05: 0,5 g hepatopankreasa po 24 h v neokuženi morski vodi + 50 µl vzorca iztrebka (915/05) pozitivnega na norovirus GGII

H₂O: 100 µl ddH₂O

M molekulami označevalec DNK (100 bp)

Izolacijo RNK smo izvedli še z metodama NucleoSpin[®] RNA II in NucleoSpin[®] RNA Plant. Tudi v teh primerih smo po RT-PCR s parom JV12Y/JV13I dobili pozitiven rezultat le pri pozitivni kontroli (Slika 4-11, koloni P4-N in II4-N).



Slika 4-11: Agarozna gelska elektroforeza produktov RT-PCR. RNK smo iz vzorcev izolirali z metodo NucleoSpin[®] RNA Plant (levo) in metodo NucleoSpin[®] RNA II (desno). Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I.

Legenda: P – izolacija z metodo NucleoSpin[®] RNA Plant; II – izolacija z metodo NucleoSpin[®] RNA II

P-1 in II-1: 0,5 g hepatopankreasa po 24 h v okuženi morski vodi

P-2 in II-2: 0,5 g hepatopankreasa po 48 h v okuženi morski vodi

P-3 in II-3: 0,5 g hepatopankreasa po 24 h v neokuženi morski vodi

P-4 in II-4: 0,5 g hepatopankreasa po 24 h v neokuženi morski vodi + 50 µl vzorca iztrebka (915/05) z dokazanimi norovirusi GGII

P-5 in II-5: 100 µl ddH₂O

M: molekularni označevalec DNK (100 bp)

Negativen rezultat smo dobili tudi pri vseh vzorcih, pri katerih smo RNK izolirali z GuSCN in siliko (ni prikazano).

Vse vzorce izolirane RNK smo testirali še z RT-PCR v realnem času s parom začetnih oligonukleotidov COG2F/COG2R in sondo TaqMan RING2. Pozitivne rezultate smo dobili le pri pozitivnih kontrolah. Najnižje vrednosti Ct smo dobili pri pomnoževanju RNK, izolirane z reagentom Trizol/PLG in najvišje vrednosti Ct pa pri RNK, izolirane z metodo z GuSCN in siliko (Preglednica 4-2).

Preglednica 4-2: Vzorci in vrednosti Ct pri RT-PCR v realnem času z COG2F/COG2R in sondo TaqMan RING2

Vzorec	Ct
+ kontrola (NucleoSpin [®] RNA Plant)	26,17
	25,58
+ kontrola (NucleoSpin [®] RNA Plant) 10 – kratna redčitev	31,46
	30,64
+ kontrola (NucleoSpin [®] RNA II)	27,83
	27,46
+ kontrola (NucleoSpin [®] RNA II) 10 – kratna redčitev	31,15
	30,33
+ kontrola (Trizol/PLG)	24,64
	24,64
+ kontrola (Trizol/PLG) 10 – kratna redčitev	28,31
	29,00
+ kontrola (GuSCN in silika)	29,24
	29,49
+ kontrola (GuSCN in silika) 10 – kratna redčitev	34,12
	35,64

+ kontrola: 0,5 g hepatopankreasa po 24 h v neokuženi morski vodi + 50 µl vzorca iztrebka (915/05) z dokazanimi norovirusi GGII

4.4 Rezultati pregleda školjk

Vzorci školjk, zbrane v obdobju od jeseni 2004 do pomladi 2006, šestnajst iz slovenskih gojišč in enega iz Grčije, smo pregledali glede norovirusov GGI in GGII.

Za določitev norovirusov GGI smo uporabili metodo RT-PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi JJVIF/JJVIR in sondo JJVI, RT-PCR z začetnimi oligonukleotidi G1/SM31 in PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi Ando/E3.

Za določitev norovirusov GGII smo uporabili metodo RT-PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi COG2F/COG2R in sondo RING2.

Pri nobenem vzorcu nismo dobili pozitivnega rezultata.

5 RAZPRAVA

Ljudje se z norovirusi pogosto okužijo s surovimi ali s toplotno slabo obdelanimi školjkami. Za okužbo je potrebna majhna infekcijska doza (<100 virusnih delcev), zato potrebujemo dovolj občutljivo metodo za določanje virusov (Norwalk-like viruses..., 2001). Komercialna uporaba školjk narašča in zato se povečuje tudi prenos norovirusov v populaciji. Za zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti školjk je rutinsko v uporabi ugotavljanje fekalnih bakterij, vendar pa so se pojavili pri ljudeh gastroenteritisi, katerih vzrok so bile školjke, ki so ustrezale Evropskim predpisom glede fekalnih bakterij (Myrmel in sod., 2004). Pri ugotavljanju norovirusov v školjkah se danes uporabljajo molekularne metode. Uporablja se klasična metoda RT-PCR (Atmar in sod., 1996; Baert in sod., 2006; Beuret in sod., 2003; Croci in sod., 2000; 2007; Green in sod., 1998; Guyader in sod., 2000; Kingsley, 2007; Myrmel in sod., 2004; Prato in sod., 2004; Schultz in sod., 2007; Shieh in sod., 2000) in RT-PCR v realnem času (Jothikumar in sod., 2005; Baert in sod., 2006; Boxman in sod., 2006; Guyader in sod., 2006).

V vzorcih iz referenčnega laboratorija Evropske unije smo dokazovali noroviruse in istočasno razlikovali noroviruse genske skupine I in II. Pri klasični metodi RT-PCR smo uporabili začetne oligonukleotide G1SKF/G1SKR, specifične za noroviruse GGI in smo viruse dokazali pri dveh vzorcih, pri vzorcu školjk (Slika 4-1) in vzorcu supernatanta (Slika 4-3 levo). Uporabili smo tudi začetne oligonukleotide G1/SM31, ki omogočajo še dodatno pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi Ando/E3. Pozitivne rezultate smo dobili šele po drugi reakciji in sicer pri dveh vzorcih supernatantov (Slika 4-4). Skupno smo torej potrdili tri od štirih, ki so vsebovali noroviruse GGI. Za dokazovanje norovirusov GGII smo uporabili začetne oligonukleotide G2SKF/G2SKR. Pozitivne rezultate smo dobili pri obeh vzorcih školjk (Slika 4-2) in treh vzorcih supernatantov (Slika 4-3 desno). S tem smo dokazali noroviruse GGII v vseh vzorcih, ki so jih vsebovali. Uporabili smo tudi začetne oligonukleotide G2/SM31, vendar nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata. Dobljene produkte smo nato pomnožili še z notranjimi začetnimi oligonukleotidi NI/E3 in dobili pozitiven rezultat pri enem vzorcu školjk (Slika 4-5). Pozitivne rezultate pri dokazovanju obeh genskih skupin norovirusov smo dobili le z začetnimi oligonukleotidi G1SKF/G1SKR oziroma G2SKF/G2SKR, ki se vežejo v kapsidni regiji genoma norovirusov. Z začetnimi oligonukleotidi, ki se vežejo na odsek polimeraznega gena (RdRp) (Green in sod., 1998), G1/SM31 oziroma G2/SM31 nismo

dobili pozitivnega rezultata. Pozitivne rezultate smo dobili šele po dodatnem pomnoževanju z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Podobne rezultate so dobili tudi Kojima in sodelavci. Primerjali so občutljivost začetnih oligonukleotidov MR3/MR4 in notranjih začetnih oligonukleotidov Yuri22F/Yuri22R, ki se vežejo v kapsidni regiji genoma norovirusov ter začetnih oligonukleotidov G1SKF/G1SKR, specifičnih za noroviruse GGI in začetnih oligonukleotidov G2SKF/G2SKR, specifičnih za noroviruse GGII. S slednjimi so noroviruse GGI oziroma GGII dokazali v večjem številu vzorcev kot z MR3/MR4, tudi po pomnoževanju z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (Kojima in sod., 2002).

Pri dokazovanju norovirusov GGI z metodo RT-PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi JJVIF/JJVIR in TaqMan sonde JJVI-pr smo pozitiven rezultat dobili le pri 100 – kratni redčitvi RNK, izolirane iz vzorca iztrebka (2299/04) (Slika 4-7). Norovirusov GGI nismo uspeli dokazati v nobenem vzorcu iz referenčnega laboratorija Evropske unije, niti v vzorcu iztrebka 1998/04 ter v redčitvah njegove izolirane RNK, kjer smo noroviruse GGI dokazali z klasičnim RT-PCR z začetnimi oligonukleotidi G1/SM31 in CapA/CapB2 (Slika 4-8). V nasprotju so Jothikumar in sodelavci z metodo RT-PCR v realnem času (JJVIF/JJVIR in TaqMan sonda JJVI-pr) dokazali noroviruse GGI pri večjem številu vzorcev školjk kot s klasično metodo RT-PCR (G1/SM31) in sledečo PCR z notranjimi začetnimi nukleotidi Ando/E3 (Jothikumar in sod., 2005). Na vzorcih RNK iz iztrebka in njenih redčitvah smo pri metodi RT-PCR v realnem času uporabili tudi začetne oligonukleotide NVLCF/NVLCR in TaqMan sondo NVGGI-pr, ki so jih uporabljali za dokazovanje norovirusov GGI kot povzročiteljev akutnih gastroenteritisov na Nizozemskem v letih 2004 in 2005 (Svraka in sod., 2007). Pri vzorcu iztrebka 1998/04 smo dobili neznačilno disociacijsko krivuljo (Slika 4-8), kar ne moremo smatrati za pozitiven rezultat (Real-Time PCR..., 2006; Nolan in sod., 2006).

Za dokazovanje norovirusov GGII smo pri metodi RT-PCR v realnem času uporabili začetne oligonukleotide COG2F/COG/2R in TaqMan sondo RING2-pr. Virusno RNK smo potrdili pri vseh treh vzorcih iztrebkov z dokazano vsebnostjo norovirusov GGII in enem vzorcu školjk iz referenčnega laboratorija Evropske unije (Preglednica 4-1). Kageyama in sodelavci so s to metodo dokazali noroviruse GGII v večjem številu vzorcev iztrebkov bolnikov kot s klasično metodo RT-PCR (G2SKF/G2SKR). Začetni oligonukleotidi COG2F/COG2R se vežejo na dele norovirusnega genoma, kjer se združita polimerazni in kapsidni del genoma. Na tem delu genoma so nukleotidna zaporedja med sevi genskih

skupin norovirusov močno ohranjena (Kageyama in sod., 2003). V vzorcih školjk so Jothikumar in sodelavci z metodo RT-PCR v realnem času (JJV2F/COG2R in sonda RING2-pr) bolj zanesljivo dokazali noroviruse GGII kot s klasično metodo RT-PCR (G2/SM31) in PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi NI/E3. Primerjali so občutljivost parov začetnih oligonukleotidov COG2F/COG2R in JJV2F/COG2R. Pri 14 sevih norovirusov GGII so z obema paroma dokazali virusno RNK (Jothikumar in sod., 2005).

Za uspešno določitev virusa z metodami pomnoževanja nukleinskih kislin je poleg izbire ustreznih začetnih oligonukleotidov najbolj pomembna uspešna izolacija virusne RNK. Izolirati je moramo zadostno količino in odstraniti inhibitorje reakcije (Schultz in sod., 2007).

Primerjali smo štiri metode izolacije RNK. Po dva hepatopankreasa vzorcev školjk iz referenčnega laboratorija in školjk, ki smo jih umetno okužili, smo homogenizirali in inkubirali v raztopini proteinaze K. Po centrifugiranju smo iz 100 µl vodne faze izolirali RNK z reagentom Trizol/PLG, s kompletoma NucleoSpin[®] RNA Plant in RNA II, oziroma z metodo z GuSCN in siliko. Izolirano RNK smo dokazovali s klasično metodo RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Pri dokazovanju virusne RNK v umetno okuženih školjkah s klasično metodo RT-PCR smo uporabili široko specifične začetne oligonukleotide JV12Y/JV13I (Vennema in sod., 2002). Pozitivne rezultate smo dobili le pri pozitivnih kontrolah, in sicer pri izolaciji RNK s Trizolom/PLG (Slika 4-10), s kompletom NucleoSpin[®] RNA Plant (Slika 4-11 levo) in kompletom NucleoSpin[®] RNA II (Slika 4-11 desno). Zaradi podobnosti med kompletoma in slabšega rezultata, kompletom NucleoSpin[®] RNA II smo uporabljali le še komplet NucleoSpin[®] RNA Plant. Pri vzorcih školjk referenčnega laboratorija Evropske unije smo uporabili par začetnih oligonukleotidov G1SKF/G1SKR za dokazovanje norovirusov GGI in par G2SKF/G2SKR za dokazovanje norovirusov GGII. Ob izolaciji s kompletom NucleoSpin[®] RNA Plant smo dokazali noroviruse GGI v enem vzorcu školjk (Slika 4-1) in noroviruse GGII v obeh vzorcih školjk ter ob izolaciji z reagentom Trizolom v enem vzorcu školjk (Slika 4-2). Ob izolaciji RNK z metodo GuSCN smo dobili pri obeh vzorcih negativen rezultat za obe genski skupini norovirusov. Pri metodi RT-PCR v realnem času z uporabo začetnih oligonukleotov COG2F/COG2R in TaqMan sonde RING2-pr smo pri vzorcih školjk iz referenčnega laboratorija pozitiven rezultat dobili le pri enem vzorcu, kjer smo RNK izolirali z reagentom Trizol. Pri vzorcih umetno okuženih školjk smo dobili negativen rezultat ob

vseh izolacijah RNK, pozitivne so bile le kontrole (Preglednica 4-2). Najnižje vrednosti Ct smo dobili ob izolaciji z reagentom Trizol in najvišje, kjer smo RNK izolirali z GuSCN in siliko (Preglednica 4-2). V vseh primerih smo najslabše rezultate dobili ob izolaciji RNK z GuSCN in siliko. To metodo kot uspešno za izolacijo virusne RNK iz tkiva školjk opisujejo Leageay in sodelavci, vendar so uporabili 5 g hepatopankreasov školjk (Leageay in sod., 2000). Cruz in sodelavci so pred izolacijo RNK z metodo GuSCN/silika homogenizirali 20 hepatopankreasov v pufru z glicinom in po centrifugiranju supernatant eno uro ultracentrifugirali pri 100.000 g in 4 °C (Cruz in sod., 2002; Cruz in sod., 2005). Komplet NucleoSpin[®] RNA II so za izolacijo RNK iz vzorcev školjk uporabljali Guyader in sodelavci. 1,5 g hepatopankreasov so predhodno homogenizirali in ekstrahirali s kloroformom in butanolom ter precipitirali z reagentom Cat-Floc in polietilenglikolom (Guyader in sod., 2006). Uporabo reagenta Trizol za izolacijo virusne RNK iz školjk opisujejo Myrmel in sodelavci. Pred izolacijo RNK so 25 g hepatopankreasov školjk homogenizirali v pufru z glicinom in po centrifugiranju 12 ml supernatanta 90 minut ultracentrifugirali pri 190.000 g in 4 °C (Myrmel in sod., 2004). Z izjemo Guyaderja in sodelavcev avtorji navajajo kar še enkrat (Leageay in sod., 2000) pa do desetkrat večje (Cruz in sod., 2002; Cruz in sod., 2005) količine izvornega materiala. Največ pozitivnih rezultatov s klasično metodo RT-PCR smo dobili ob izolaciji z kompletom NucleoSpin[®] RNA Plant, vendar smo ob izolaciji z reagentom Trizol/PLG dobili najboljše rezultate pri določanju virusne RNK z metodo RT-PCR v realnem času. Poleg tega smo pri izolaciji z reagentom Trizol/PLG lahko povečali količino vzorca iz 100 µl na 250 µl, zato smo izbrali to metodo za izolacijo RNK pri pregledu zbranih 16 vzorcev školjk iz Piranskega zaliva in vzorca iz Grčije. Virusno RNK v vzorcih smo dokazovali z metodo RT-PCR v realnem času, kjer smo za dokazovanje norovirusov GGII uporabili začetne oligonukleotide COG2F/COG2R in TaqMan sondo RING2-pr ter za dokazovanje norovirusov GGI začetne oligonukleotide JJVIF/JJVIR in TaqMan sondo JJVI-pr. Slednje smo dokazovali tudi z klasično metodo RT-PCR (G1/SM31) in dodatnim pomnoževanjem z notranjimi začetnimi oligonukleotidi Ando/E3. Pri vseh vzorcih smo dobili negativen rezultat.

5.1 SKLEPI

- Noroviruse GGII smo v vzorcih iz referenčnega laboratorija Evropske unije uspešno dokazali s klasično metodo RT-PCR (G2SKF/G2SKR). Metoda RT-PCR v realnem času je bolj občutljiva, vendar manj specifična.
- V vzorcih referenčnega laboratorija smo navzočnost norovirusov GGI dokazali pri dveh vzorcih z metodo RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma G1SKF/G1SKR. Pri dveh vzorcih smo RNK norovirusov dokazali z RT-PCR (G1/SM31) po dodatnem pomnoževanju z notranjimi začetni oligonukleotidi Ando/E3. Eden od teh vzorcev je bil pozitiven z obema klasičnima metodama RT-PCR. S klasično metodo RT-PCR smo torej uspeli dokazati RNK norovirusov GGI v treh od štirih vzorcev.
- Za najbolj primerno metodo izolacije virusne RNK se je izkazala izolacija s kompletom NucleoSpin[®] RNA Plant pri dokazovanju norovirusov s klasično metodo RT-PCR ter izolacija RNK z reagentom Trizol pri dokazovanju norovirusov z RT-PCR v realnem času.
- V vzorcih školjk iz Piranskega zaliva in vzorcu iz Grčije, zbranih v obdobju od jeseni 2004 do pomladi 2006, nismo dokazali norovirusov.

6 POVZETEK

Gastroenteritis je med najpogostejšimi obolenji pri ljudeh. Norovirusi iz družine *Caliciviridae* v razvitih državah povzročajo do 80 % akutnih gastroenteritisov. Zaradi njihove odpornosti na okoljske dejavnike in majhne infekcijske doze, ki je potrebna za okužbo, predstavljajo glavni problem pri okužbah, ki so povezana z uživanjem školjk. Norovirusi se ne razmnožujejo v školjkah, vendar se le te prehranjujejo z filtacijo morske vode in posledično koncentrirajo virusne delce iz fekalno onesnažene vode.

V Evropski uniji veljajo posebni predpisi, ki določajo bakteriološke analize školjk in vode, v kateri jih gojijo za pokazatelje fekalnega onesnaženja. Virusi dlje preživijo v morskem okolju kot bakterijski patogeni, zato so lahko školjke, ki ustrezajo bakterijskim standardom, okužene z virusi. Tudi depuracijski postopki, ki uspešno odstranijo iz školjk bakterije, iz njih ne odstranijo virusov.

Za izolacijo ali razmnoževanje norovirusov še ni razvit noben sistem celične kulture ali živalski model. Zato se danes za določanje virusne RNK v vzorcih hrane uporablja klasična metoda RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Pri tem je pomembno, da izberemo ustrezne začetne oligonukleotide, s katerimi lahko pomnožujemo genom različnih norovirusnih genotipov. Da lahko dokazujemo virusno RNK v školjkah, jo moramo najprej osamiti iz prebavne žleze školjk v čisti obliki brez inhibitorjev encimske reakcije.

V naši raziskavi smo dokazovali noroviruse v vzorcih iz referenčnega laboratorija Evropske unije. Pri tem smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so nam omogočili razlikovanje med norovirusi genske skupine I in II. Virusno RNK smo dokazovali s klasično metodo RT-PCR. Uporabili smo začetne oligonukleotide G1SKF/G1SKR za noroviruse GGI in G2SKF/G2SKR za noroviruse GGII, ki se vežejo na kapsidni del norovirusne RNK. Uporabili smo tudi začetne oligonukleotide G1/SM31 (GGI) in G2/SM31 (GGII), ki se vežejo na polimerazni del genoma norovirusov in omogočajo dodatno pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Noroviruse GGI smo skupno dokazali v treh od štirih vzorcev in noroviruse GGII pri vseh petih vzorcih. Z metodo RT-PCR v realnem času smo dokazali noroviruse GGII v enem vzorcu.

Za osamitev RNK iz prebavnih žlez školjk smo primerjali štiri različne metode. Pri dokazovanju norovirusov s klasično metodo RT-PCR se je za najbolj primerno metodo

izolacije virusne RNK izkazala metoda s kompletom NucleoSpin[®] RNA Plant ter izolacija RNK z reagentom Trizol pri dokazovanju norovirusov z RT-PCR v realnem času.

Glede norovirusov GGI in GGII smo pregledali 17 zbranih vzorcev školjk. Od tega 16 vzorcev iz Piranskega zaliva in en vzorec iz Grčije. Norovirusov nismo dokazali.

7 VIRI

- Adler J. L., Zickl R. 1969. Winter vomiting disease. *Journal of Infectious Diseases*, 119: 668–673
- Ando T., Monroe S.S., Gentsch J.R., Jin Q., Lewis D.C., Glass R.I. 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1: 64-71
- Ando T., Noel J.S., Frankhauser R.L. 2000. Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 336-348
- Arnheim N., Erlich H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry*, 61: 131-156
- Atmar R.L., Estes M.K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 1: 15-37
- Atmar R.L., Neill F.H., Woodley C.M., Manger R., Fout G.S., Burkhardt W., Leja L., McGovern E.R., Guyader F., Metcalf T.G., Estes M.K. 1996. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1: 254-258
- Beart L., Uyttendaele M., Debevere J. 2006. Evaluation of two viral extraction methods for the detection of human noroviruses in shellfish with conventional and real-time reverse transcriptase PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 106-111
- Beuret C., Baumgartner A., Schlupe J. 2003. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4: 2292-2297
- Billgren M., Christenson B., Hedlund K.O., Vinjé. 2002. Epidemiology of Norwalk-like human caliciviruses in hospital outbreaks of acute gastroenteritis in the Stockholm area in 1996. *Journal of Infection*, 44: 26-32
- Boxman I.L.A., Tilburg J.J.H.C., Loeke N.A.J.M., Vennema H., Jonker K., Boer E., Koopmans M. 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 391-396
- Caul E.O. 1996. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part 1. The clinical and diagnostic perspective. *Journal of Clinical Pathology*, 49: 874-880
- Clarke I.N., Lambden P.R. 1997. The molecular biology of caliciviruses. *Journal of General Virology*, 78: 291-301
- Croci L., Losio M.N., Suffredini E., Pavoni E., Pasquale S., Fallacara F., Arcangeli G. 2007. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 2: 252-257

- Croci L., Medici D., Scalfaro C., Fiore A., Divizia M., Donia D., Cosentino A.M., Moretti P., Constantini G. 2000. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic sea mussels. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 293-298
- Cruz M.F., Hundesa A., Casares P.C., Gimenez N.A., Allard A., Girones R. 2005. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*, 125: 111-118
- Cruz M.F., Quesada G.T., Mas S.B., Lees D.N., Henshilwood K., Allard A.K., Hansson A.C.C., Hernroth B.E., Vantarakis A., Tsibouxi A., Papapetropoulou M., Furones M.D., Girones R. 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12: 5990-5998
- Desselberger U., Gray J. 2005. Viral gastroenteritis. *Medicine*, 33: 78-81
- Dolenc D. 2007. Molekularno določanje kalicivirusov v iztrebkih prašičev. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 56 str.
- Duizer E., Schwab K.J., Neill F.H., Atmar R.L., Koopmans M.P.G., Estes M.K. 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85: 79-87
- Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2005. 2006. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 86 str.
- Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252: 1643-1650
- Ewald D., Franks C., Thompson S., Patel M.S. 2000. Possible community immunity to small round structured virus gastroenteritis in a rural Aboriginal community. *Communicable Diseases Intelligence*, 24, 3: 48-50
- Frankhauser R.L., Monroe S.S., Noel J.S., Humprey C.D., Bresee J.S., Parashar U.D., Ando T., Glass R.I. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, 186: 1-7
- Frankhauser R.L., Noel J.S., Monroe S.S., Ando T., Glass R.I. 1998. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, 178: 1571-1578
- Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M. 2007. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6: 995-1001
- Goller J.L., Dimitriadis A., Tan A., Kelly H., Marshall J.A. 2004. Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *Journal of Hospital Infection*, 58: 286-291
- Gordon I., Ingraham H.S., Korn R.F. 1947. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *Journal of Experimental Medicine*, 86, 5: 409-422

- Graham D.Y., Jiang X., Tanaka T., Opekun A.R., Madore H.P., Estes M.K. 1994. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *Journal of Infectious Diseases*, 170: 134-143
- Green J., Henshilwood K., Gallimore C.I., Brown D.W.G., Lees D.N. 1998. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated Molluscan shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3: 858-863
- Green J., Norcott J.P., Lewis D., Arnold C., Brown D.W.G. 1993. Norwalk-like viruses: demonstration of genomic diversity by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 11: 3007-3012
- Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J., Thiel H.J. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 322-330
- Guyader F.S., Bon F., DeMedici D., Parnaudeau S., Bertone A., Crudeli S., Doyle A., Zidane M., Suffredini E., Kohli E., Maddalo F., Monini M., Gallay A., Pommepuy M., Pothier P., Ruggeri F. 2006. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 11: 3878-3882
- Guyader F.S., Haugarreau L., Miossec L., Dubois E., Pommepuy M. 2000. Three year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8: 3241-3248
- Hardy M.E. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiology Letters*, 253: 1-8
- Hauffman D.E., Nelson K.L., Rose J.B., 2003. Calicivirus-an emerging contaminant in water: state of the art. *Environmental Engineering Science*, 20, 5: 503-515
- Hutson A.M., Atmar R.L., Estes M.K. 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiology*, 12, 6: 279-287
- Hutson A.M., Atmar R.L., Graham D.Y., Estes M.K. 2002. Norwalk virus infection and disease in associated with ABO histo-blood group type. *Journal of Infectious Diseases*, 185: 1335-1337
- ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. 2006. ICTVdB virus description. New York, Columbia University (april 2006)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.012.htm> (december 2006): 5 str.
- Jiang X., Wang J., Graham D.Y., Estes M.K. 1992. Detection of Norwalk virus in Stool by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 10: 2529-2534
- Jothikumar N., Lowther J.A., Henshilwood K., Lees D.N., Hill V.R., Vinjé J. 2005. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-

- PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4: 1870-1875
- Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4: 1548-1557
- 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. *Journal of Virology*, 10:1075–1081
- Katayama K., Horikoshi H.S., Kojima S., Kageyama T., Oka T., Hoshino F.B., Fukushi S., Shinohara M., Uchida K., Suzuki Y., Gojobori T., Takeda N. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*, 299: 225-239
- Kingsley D.H. 2007. An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses. *Journal of Virological Methods*, 141, 1: 58-62
- Kojima S.K., Kageyama T., Fukushi S., Hoshino F.B., Shinohara M., Uchida K., Natori K., Takeda N., Katayama K. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of Virological Methods*, 100: 107-114
- Koopmans M., Bonsdorff C.H., Vinjé J., Medici D., Monroe S. 2002a. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 187-205
- Koopmans M., Strien E., Vennema H. 2002b. Molecular epidemiology of human caliciviruses. V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 509-540
- Lees D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 81-116
- Legeay O., Caudrelier Y., Cordevant C., Gois L.R., Lange M. 2000. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 90: 1-14
- Lopman B.A., Brown D.W., Koopmans M. 2002. Human caliciviruses in Europe. *Journal of Clinical Virology*, 24: 137-160
- Lopman B.A., Reacher M., Gallimore C., Adak G.K., Gray J.J., Brown D.W.G. 2003. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health*, 3: art. 13, doi:10.1186/1471-2458-3-13
<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/13>
- McCarthy M., Estes M.K., Hyams K.C. 2000. Norwalk-like viruses infection in military forces: epidemic potential, sporadic disease, and the future direction of prevention and control efforts. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 387-391

- Mounts A.W., Ando T., Koopmans M., Bresee J.S., Noel J., Glass R.I. 2000. Cold weather seasonality of gastroenteritis associates with Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 284-287
- Myrmel M., Berg E.M.M., Rimstad E., Grinde B. 2004. Detection of enteric shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5: 2678-2684
- Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1, 3: 1559-1582
- Norwalk-like viruses: public health consequences and outbreak management. 2001. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 24 str.
- Oliver S.L., Dastjerdi A.M., Wong S., Attar L.E., Gallimore C., Brown D.W.G., Green J., Bridger J.C. 2003. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *Journal of Virology*, 77, 4: 2789-2798
- Parrino T.A., Schreiber D.S., Trier J.S., Kapikian A.Z., Blacklow N.R. 1977 Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *New England Journal of Medicine*, 297: 86-89
- Prasad B.V.V., Hardy M.E., Estes M.K. 2000. Structural studies of recombinant Norwalk capsids. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 317-321
- Prato R., Lopalco P.L., Chironna M., Barbuti G., Germinario C., Quarto M. 2004. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BioMed Central Public Health*, 4: art. 37, doi:10.1186/1471-2334-4-37
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/4/37>
- Promega. 2005. Access RT-PCR. Madison, Promega
<http://www.promega.com/tbs/tb220/tb220.html> (november 2005)
- Real-Time PCR versus traditional PCR. 2006. Foster City, Applied Biosystems
www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf (maj 2007): 13 str.
- Rockx B. 2004. Norovirus infections: disease, antibody responses and susceptibility. Utrecht, Universiteit Utrecht
<http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2004-1203-115836/index.htm>
(oktober 2005): 140 str.
- Rockx B., Wit M., Vennema H., Vinjé J., Bruin E., Duynhoven Y., Koopmans M. 2002. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 246-253
- Sánchez-Fauquier A., Wilhelmi I., Roman E., Colomina J., Montero V., Negrodo A. 2005. Surveillance of Human Calicivirus in Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 8: 1327-1329

- Schreiber D.S., Blacklow N.R., Trier J.S. 1973. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 288: 1318-1323
- Schreiber D.S., Blacklow N.R., Trier J.S. 1974. The small intestine lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 129: 705-708
- Schultz A.C., Saadbye P., Hoorfar J., Nørrung B. 2007. Comparison of methods for detection of norovirus in oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 352-356
- Schwab K.J., Neill F.H., Frankhauser R.L., Daniels N.A., Monroe S.S., Sweat D.A.B., Estes M.K., Atmar R.L. 2000. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and Hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 213-218
- Shieh Y.S.C., Monroe S.S., Frankhauser R.L., Langlois G.W., Burkhard III W., Baric R.S. 2000. Detection of Norwalk-like viruses in shellfish implicated in illness. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 360-366
- Svraka S., Duizer E., Vennema H., Briun E., Veer B., Dorresteyn B., Koopmans M. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 5: 1389-1394
- Tan M., Jiang X. 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends in Microbiology*, 13, 6: 285-293
- Vennema H., Bruin E., Koopmans M. 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, 25: 233-235
- Vinje J., Hamidajaja R.A., Sobsey M.D. 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods*, 116: 109-117
- Vinje J., Koopmans M. P.G. 2000. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 7: 2595-2601
- Vinje J., Vennema H., Maunula L., Bonsdorff C.H., Hoehne M., Schreier E., Richards A., Green J., Brown D., Beard S.S., Monroe S.S., Bruin E., Svensson L., Koopmans M.P.G. 2003. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 4: 1423-1433
- Zahorsky J. 1929. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Archives of Pediatrics*, 46:391-395
- Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346: 312-323

ZAHVALA

Zahvaljujem se dr. Darji Barlič Maganja za mentorstvo, nasvete in usmerjanje pri delu v laboratoriju in pisanju diplomske naloge.

Hvala Sari Mankoč za pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Jožici Marin za hiter in temeljit pregled diplomske naloge in recenzentki prof. dr. Tatjani Avšič Županc za recenzijo diplomskega dela.

Hvala vsem prijateljem in predvsem Simoni za spodbudo in razumevanje.

Hvala staršema, ki sta mi omogočila optimalne pogoje za življenje ter vso podporo in spodbudo tekom celotnega študija.