

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Damjan RAJAPAKSE JERINA

**DOKAZOVANJE NOROVIRUSOV IN
SAPOVIRUSOV (*Caliciviridae*) V IZTREBKIH
PRAŠIČEV V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Damjan Rajapakse Jerina

**DOKAZOVANJE NOROVIRUSOV IN SAPOVIRUSOV (*Caliciviridae*)
V IZTREBKIH PRAŠIČEV V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF NOROVIRUSES AND SAPOVIRUSES
(*Caliciviridae*) IN STOOL OF SWINE IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Jožico Marin, za somentorico dr. Matejo Poljšak-Prijatelj in za recenzentko dr. Darjo Barlič Maganja.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin

Somentorica: dr. Mateja Poljšak-Prijatelj

Recenzentka: prof. dr. Darja Barlič Maganja

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Jožica MARIN

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

Članica: dr. Mateja POLJŠAK-PRIJATELJ

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

Članica: prof. dr. Darja BARLIČ MAGANJA

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Datum zagovora:

Damjan Rajapakse Jerina

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 578.2 + 578.7: 578.835.3(043) = 163.6
KG virusi/*Caliciviridae*/kalicivirusi/norovirusi/sapovirusi/prašičji iztrebki/prašičji kalicivirusi/določanje kalicivirusov/molekularne metode/RT PCR
AV RAJAPAKSE JERINA, Damjan
SA MARIN, Jožica (mentorica)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (somentorica)/BARLIČ-MAGANJA, Darja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2008
IN DOKAZOVANJE NOROVIRUSOV IN SAPOVIRUSOV (*Caliciviridae*) V IZTREBKIH PRAŠIČEV V SLOVENIJI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 46 str., 9 pregl., 7 sl., 80 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kalicivirusi, (norovirusi in sapovirusi) so pogosti povzročitelji akutnega, virusnega gastroenteritisa tako v Sloveniji kot tudi v svetu. Še posebej izpostavljene so bolnišnice, domovi za ostarele in druge ustanove, kjer se okužba zaradi oralno-fekalne poti prenosa in nizkega infektivnega odmerka lahko hitro širi. Znotraj družine *Caliciviridae* ločimo štiri rodove: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus* in *Lagovirus*. Rezervoar za noroviruse in sapoviruse še ni znan. Eden od možnih rezervoarjev so domače živali, predvsem govedo in prašiči. Namen diplomskega dela je bil, da z molekularnimi metodami dokažemo kalicivirusno RNA in tako ocenimo možnost obstoja rezervoarja norovirusov in sapovirusov pri prašičih na nekaterih slovenskih farmah in kmetijah. Iz zbranih iztrebkov zdravih prašičev smo izolirali RNA, ki smo jo pomnoževali z RT-PCR. Z izbranimi pari začetnih oligonukleotidov (JV12Y/JV13I za noroviruse in SR80/JV33 za sapoviruse) smo pomnoževali polimerazni odsek genoma. Pridelke pomoževanja smo pregledali z gelsko elektroforezo. Norovirusno in sapovirusno RNA smo potrdili pri vseh starostnih skupinah prašičev. Največje število pozitivnih vzorcev smo določili v zimskih mesecih.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.2 + 578.7: 578.835.3(043) = 163.6
CX viruses/*Caliciviridae*/caliciviruses/noroviruses/sapoviruses/swine faeces/swine caliciviruses/detection of caliciviruses/molecular techniques/RT PCR
AU RAJAPAKSE JERINA, Damjan
AA MARIN, Jožica (supervisor)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (co-advisor)/BARLIČ-MAGANJA, Darja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2008
TI DETECTION OF NOROVIRUSES AND SAPOVIRUSES (*Caliciviridae*) IN STOOL OF SWINE IN SLOVENIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 46 p., 9 tab., 7 fig., 80 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Caliciviruses (noroviruses and sapoviruses) are a frequent causative agents of an acute viral gastroenteritis in Slovenia and worldwide. Hospitals, Homes for the elderly and similar institutions are especially vulnerable because caliciviruses are transmitted through the fecal-oral route and are highly contagious. *Caliciviridae* family is divided into four genera: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus* and *Vesivirus*. Noroviruses and sapoviruses infect mainly humans, while lagoviruses and vesiviruses cause systemic diseases in animals. A reservoir for noroviruses and sapoviruses still remains unknown, but the potential reservoir could be found in domestic animals, particularly in swine and cattle. The aim of this graduation thesis was to screen swine stool samples from several Slovenian farms for norovirus and sapovirus RNA using molecular methods and to find the possible reservoir for these viruses. Viral RNAs were isolated from stool samples of mostly healthy pigs. Conserved polymerase segments of norovirus and sapovirus genome were amplified by the use of primer pair JV12Y/JV13I for noroviruses and SR80/JV33 for sapoviruses. Amplified products were determined by gel electrophoresis. Norovirus and sapovirus RNAs were detected in all age groups of swine with the highest prevalence in winter months.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 NAMEN.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV.....	3
2.2 RAZDELITEV ČREVESNIH KALICIVIRUSOV V GENSKE SKUPINE.....	5
2.3 GENOM KALICIVIRUSOV.....	8
2.3.1 Genom norovirusov in sapovirusov	8
2.4 STRUKTURA KALICIVIRUSOV.....	9
2.5 RAZMNOŽEVANJE.....	10
2.6 PATOGENEZA KALICIVIRUSNIH OKUŽB.....	10
2.7 PRENOS VIRUSOV IN KLINIČNI ZNAKI.....	11
2.8 IMUNOST.....	12
2.9 EPIDEMIOLOGIJA.....	12
2.10 DIAGNOSTIKA.....	14
2.10.1 Elektronska mikroskopija	14
2.10.2 Encimsko imunska metoda	15
2.10.3 Molekularne metode	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.1.1 Kemikalije	17
3.1.1.1 Reagenti potrebni za osamitev RNA s Trizolom.....	17
3.1.1.2 Reagenti potrebni za reakcijo RT-PCR (Access RT-PCR System, Promega, ZDA).....	17
3.1.1.3 Reagenti potrebni za reakcijo RT-PCR (Superscript Platinum one step RT-PCR kit, Invitrogen, ZDA).....	17
3.1.1.4 Reagenti potrebni za analizo PCR pridelkov v agaroznem gelu.....	18
3.1.2 Potrošni material	18
3.1.3 Laboratorijska oprema	19
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Zbiranje in shranjevanje vzorcev	19
3.2.2 Osamitev RNA s Trizolom	20
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo	21
3.2.3.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo.....	21
3.2.3.2 Enostopenjska verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo.....	21
3.3.3 Analiza pridelkov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu	24
4 REZULTATI	26
4.1 ZNAČILNOST VZORCEV.....	26
4.2 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA NOROVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma JV12Y/JV13I.....	26
4.3 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA SAPOVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma SR80/JV33.....	29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	32
5.1 RAZPRAVA.....	32

5.2 SKLEPI	34
6 POVZETEK	35
7 VIRI	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1.: Razdelitev človeških norovirusov (Koopmans in sod., 2002).....	6
Preglednica 2.2.: Razdelitev človeških sapovirusov (Farkas in sod., 2004).....	7
Preglednica 2.3.: Razdelitev živalskih kalicivirusov (USDA, 2003; Han in sod., 2004; Wang in sod., 2005).....	7
Preglednica 3.1.: Nukleotidni zaporedji in mesti prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov JV12Y in JV13I (Vennema in sod., 2002).....	23
Preglednica 3.2.: Nukleotidni zaporedji in mesti prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov SR80 in JV33 (Vinjé in sod., 2000).....	23
Preglednica 3.3.: Časovni in temperaturni potek verižne reakcije s polimerazo pri dokazovanju norovirusne RNA.....	24
Preglednica 3.4.: Časovni in temperaturni potek verižne reakcije s polimerazo pri dokazovanju sapovirusne RNA.....	24
Preglednica 4.1.: Število združenih vzorcev glede na starost živali.....	26
Preglednica 4.2.: Število vzorcev pregledanih na sapovirusne glede na starost živali.....	29

KAZALO SLIK

Slika 2.1.: Dendrogram na podlagi genetskih različnosti v kapsidnem genu družin <i>Caliciviridae</i> in <i>Picornaviridae</i> (Green in sod., 2000).....	5
Slika 2.2.: Virus Norwalk – A: krioelektronska mikroskopska slika. B: Računalniški prikaz strukture virusa Norwalk s kapsidnim proteinom (Prasad in sod., 1999).....	10
Slika 2.3.: A: Elektronsko mikroskopski posnetek sapovirusov v iztrebku bolnika z gastroenteritisom. (Williams F.P., 2008) B: Elektronsko mikroskopski posnetek norovirusov (IFREMER, 1994).....	15
Slika 4-1.: Agarozni gel z vzorci pomnoženega tarčnega odseka genoma norovirusov s parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I.....	27
Slika 4-2.: Rezultati pomnoževanja polimeraznega dela genoma norovirusov s parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I v iztrebkih sesnih, odstavljenih in pitanih prašičev.....	28
Slika 4-3.: Agarozni gel z vzorci pomnoženega tarčnega polimeraznega odseka genoma sapovirusov s parom začetnih oligonukleotidov SR80/JV33.....	30
Slika 4.4.: Rezultati pomnoževanja polimeraznega odseka genoma sapovirusov s parom začetnih oligonukleotidov SR80/JV33 v iztrebkih sesnih, odstavljenih in pitanih prašičev.....	31

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMV	- virus ptičje mieloblastoze (angl.: Avian Myeloblastosis Virus)
bp	- bazni par
cDNA	- komplementarna DNA (angl.: complementary DNA)
Da	- dalton
ddH ₂ O	- demineralizirana destilirana voda
DNA	- deoksiribonukleinska kislina
dNTP	- deoksinukleotid trifosfat
EM	- elektronska mikroskopija
ELISA	- encimsko imunski test (angl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FCV	- mačji kalicivirus (angl.: Feline Calicivirus)
GGI	- genska skupina I
GGII	- genska skupina II
GGIII	- genska skupina III
HuCV	- človeški kalicivirus (angl.: Human Calicivirus)
ICTV	- Mednarodno združenje za taksonomijo virusov (angl.: International Comitee on Taxonomy of Viruses)
ORF	- odprt bralni okvir (angl.: open reading frame)
PCR	- verižna reakcija s polimerazo (angl.: Polymerase Chain Reaction)
PEC	- prašičji črevesni kalicivirus (angl.: Porcine Enteric Calicivirus)
RHDV	- virus zajčje hemoragične bolezni (angl.: Rabbit Hemorrhagic Disease Virus)
RNA	- ribonukleinska kislina (angl.: Ribonucleic acid)
RT	- reverzna transkripcija
SMSV	- virus morskega leva San Miguel (angl.: San Miguel Sea lion Virus)
SRSV	- manjši okrogli strukturirani virusi (angl.: small round structured viruses)
<i>Taq</i>	- <i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tfl</i>	- <i>Thermus flavus</i>

- USDA - Ministrstvo za kmetijstvo Združenih držav Amerike (angl.: United States Department of Agriculture)
- VES - vezikularni eksantem pri prašičih (angl.: Vesicular Exanthema of Swine)
- VESV - virus vezikularnega eksantema pri prašičih (angl.: Vesicular Exanthema of Swine Virus)

1 UVOD

Poleg rotavirusov in enteričnih adenovirusov so v 90. letih letih prejšnjega stoletja kot povzročiteljev virusnega gastroenteritisa prepoznali tudi več manjših virusov. Z razvojem molekularnih tehnik so ugotovili, da so manjši, okrogli strukturirani virusi SRSV (angl.: small round structured viruses), ki so jih kasneje uvrstili v družino *Caliciviridae*, glavni vzrok mnogih izbruhov diareje in bruhanja v raznolikih okoljih (Fankhauser in sod., 1998). V tej družini so poimenovali dva rodova človeških kalicivirusov in sicer *Norovirus* in *Sapovirus* (Mayo, 2002).

Kalicivirusi so ikozaedrični virusi brez ovojnice. Z elektronsko mikroskopijo so na površini virusov vidne vdolbine v obliki čaš, po katerih je družina virusov tudi poimenovana (lat.: *Calyx* pomeni čaša). Genom je linearna, enojnovijačna, pozitivno polarna RNA. Pri ljudeh kalicivirusi povzročajo akutni gastroenteritis in razširjeni so po vsem svetu. Prenos virusov je fekalno-oralni. Med ljudmi se širijo z neposrednim stikom, aerosoli, ki nastanejo pri bruhanju ter s kontaminirano hrano in vodo (Pether in Caul, 1983; Koopmans in Duizer, 2004). Okužijo se lahko ljudje vseh starosti (Koopmans in sod., 2002; Lopman in sod., 2002).

Že dolgo je znano, da so poleg človeka okužbam kalicivirusov izpostavljene tudi živali (Van der Poel, 2000). Do danes so kaliciviruse izolirali iz mnogih živalskih vrst (govedo, prašiči, mačke,...) (Mayo 2002). Klinični znaki in posledice bolezni, ki jih povzročajo kalicivirusi, se razlikujejo od vrste do vrste. Najbolj zaskrbljujoča pa so odkritja virusov, podobnih človeškim sevom norovirusov in sapovirusov, v iztrebkih goveda in prašičev (van der Poel, 2000). Ti predstavljajo možen rezervoar kalicivirusov, ki lahko zaradi fekalno-oralne poti prenosa predstavljajo nevarnost za ljudi, ki so s temi živalmi v stiku.

Človeški kalicivirusi se ne razmnožujejo v celičnih kulturah. Njihovo določanje poteka z elektronsko mikroskopijo, encimsko-immunskimi metodami in v zadnjih letih predvsem z molekularnimi metodami, predvsem z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) (Atmar in Estes, 2001).

1.1 NAMEN

Namen diplomskega dela je bil, da ugotovimo navzočnost in razširjenost norovirusov in sapovirusov (družina *Caliciviridae*) med zdravimi prašiči različnih starosti na nekaterih slovenskih farmah oziroma kmetijah ter na ta način ugotovimo ali so živali rezervoar sevov kalicivirusov, ki povzročajo bolezni tudi pri ljudeh.

Pričakovali smo, da bomo v vzorcih izrebkov živali dokazali RNA norovirusov in sapovirusov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Razvoj primerne klasifikacijskega sistema za določeno skupino organizmov je odvisen predvsem od razvoja metod, ki jih uporabljamo za študij te skupine. Tudi taksonomija družine *Caliciviridae* to potrjuje, saj je bilo potrebnih veliko let raziskav za njeno uveljavitev.

Prva bolezen, za katero vemo, da so jo povzročili kalicivirusi, je bil izbruh vezikularnega eksantema prašičev (angl.: VES – vesicular exanthema of swine) v ZDA leta 1932 (Traum, 1936). Sprva so menili, da gre za slinavko in parkljevko, vendar z imunološkimi študijami niso mogli povezati VES z virusom slinavke in parkljevke. Šele leta 1968 so opisali povzročitelja VES kot majhen, ikozaedričen RNA virus ter ga poimenovali virus vezikularnega eksantema prašičev (VESV - angl.: vesicular exanthema of swine virus) (Wawrzkiwicz in sod., 1968). Druga bolezen, ki so jo že zgodaj povezali s kalicivirusi, je bila bolezen dihal pri mačkah, ki jo je povzročal mačji kalicivirus (angl.: FCV – feline calicivirus) na Novi Zelandiji (Fastier, 1957).

Na osnovi opazovanja morfologije virusov v elektronskem mikroskopu so sprva menili, da spadata VESV in FCV v družino *Picornaviridae*. Vendar je kmalu postalo jasno, da se ti virusi ločijo od pikornavirusov glede na strukturo, način razmnoževanja in po fizikalno kemijskih lastnostih (Burroughs in sod., 1974).

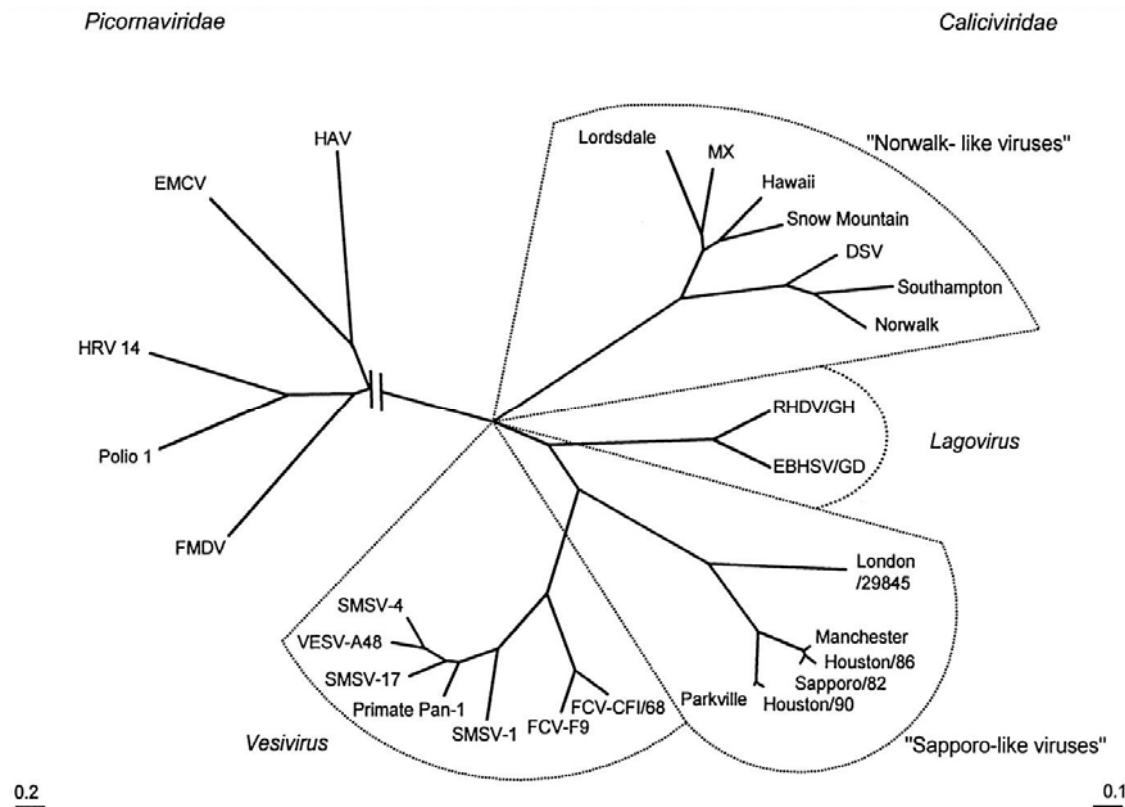
Novo družino, imenovano *Caliciviridae*, so prvič omenili v Tretjem poročilu mednarodnega združenja za taksonomijo virusov (ICTV) leta 1979. Skupne značilnosti virusov iz te nove družine so vključevale: navzočnost enega samega strukturnega proteina, ki sestavlja kapsido; na površini viriona je bilo vidnih 32 čašastih vdolbin razporejenih v ikozaedrično simetrijo, ki so dale družini tudi ime; na 5' koncu virionske RNA ni metilirane skupine ter na RNA vezan majhen protein, ki je ključen za infektivnost virusa (Burroughs in sod., 1978). Dodatna potrditev, da gre za samostojno

družino, je prišla po objavi celotnega aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja kalicivirusnega genoma, ki je pokazala, da je genom kalicivirusov organiziran v 2 ali 3 odprte bralne okvirje, medtem, ko ima genom pikornavirusov le en sam odprt bralni okvir.

Uveljavitev kalicivirusov kot samostojne družine je postavila temelje za proučevanje taksonomije njenih predstavnikov. Norwalk virus, ki je dobil ime po izbruhu gastroenteritisa v osnovni šoli mesta Norwalk v Ohio, je postal referenčni virus za skupino morfološko podobnih virusov, do takrat imenovanih SRSV (angl.: small round structured viruses), ki so bili pogosto povezani z gastroenteritisom. To skupino so poimenovali Norwalku podobni virusi (angl.: Norwalk-like viruses - NLV) (Kapikian in sod., 1972), pred nekaj leti pa so jih preimenovali v noroviruse (Green in sod., 2000).

Druga skupina kalicivirusov, t. i. humani kalicivirusi (HuCV) se je od NLV virusov razlikovala po morfologiji. Večina virusov, ki so jih odkrili v skupini HuCV, ni bila dovolj značilna, da bi določili referenčno vrsto. To so določili šele leta 1985. Referenčna vrsta je postal virus Sapporo (SV), ki so ga povezovali z gastroenteritisom pri dojenčkih ter majhnih otrocih v Sapporu na Japonskem leta 1982 (Nakata in sod., 1985). To skupino so poimenovali Sapporo-like viruses (SLV), kasneje pa preimenovali v sapoviruse (Pringle, 1998).

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja so določili še dva rodova v družini *Caliciviridae* in sicer *Lagovirus* in *Vesivirus*. Virusi iz slednjih dveh rodov povzročajo vrsto različnih bolezni pri živalih. Dendrogram družine *Caliciviridae* in *Picornaviridae* prikazuje slika 2.1.



Slika 2.1: Dendrogram na podlagi genetskih različnosti v kapsidnem genu družin *Caliciviridae* in *Picornaviridae*. (Green in sod., 2000).

Virusi iz družine *Caliciviridae* so danes razvrščeni v štiri rodove:

- *Vesivirus* (referenčna vrsta: virus vezikularnega eksantema prašičev)
- *Lagovirus* (referenčna vrsta: virus kunje hemoragične bolezni)
- *Sapovirus* (referenčna vrsta: virus Sapporo)
- *Norovirus* (referenčna vrsta: virus Norwalk)

(Atmar in Estes, 2001).

2.2 RAZDELITEV ČREVESNIH KALICIVIRUSOV V GENSKE SKUPINE

Rod *Norovirus* se deli v vsaj pet genskih skupin glede na genetske različnosti v polimerazni in kapsidni regiji (Ando in sod., 2000). Obstajajo pa različne razdelitve genskih skupin norovirusov na genotipe (Preglednica 2.1). Virusi, ki spadajo v isti genotip, imajo več kot 80 % podobnost v aminokislinskem zaporedju kapsidnega proteina

in več kot 85 – 90 % v nukleotidnem zaporedju na polimeraznem delu genoma (Vinje in sod., 2000; Koopmans in sod., 2002).

Preglednica 2.1: Porazdelitev norovirusov (Koopmans in sod., 2002).

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
GGIII	goveji			
GGIV	humani			
GGV	mišji			

Rod *Sapovirus* so pred kratkim glede na sorodstvene razdalje in filogenetske analize 17 kapsidnih regij razdelili na 9 genotipov znotraj petih genskih skupin. Sevi iz genskih skupin I, II, IV in V (Preglednica 2.2) okužijo ljudi, sev iz genske skupine III pa okuži prašiče (Farkas in sod., 2004).

Preglednica 2.2: Porazdelitev človeških sapovirusov (Farkas in sod., 2004;).

Družina	Rod	Genska skupina	Genotip	Referenčni sev
<i>Caliciviridae</i>	<i>Sapovirus</i>	GGI	1	Sapporo
			2	Parkville
			3	Stockholm
		GGII	1	London
			2	Mexico
			3	Cruise ship
		GGIV		Houston
		GGV		Argentina

Preglednica 2.3: Razdelitev živalskih kalicivirusov (USDA, 2003; Han in sod., 2004; Wang in sod., 2005).

Rod	Vrsta	Sev
<i>Vesivirus</i>	virus vezikularnega eksantema prašičev	VESV-A48
	goveji kalicivirus	BCV Bos-1
	mačji kalicivirus	FCV-F9
	pasji kalicivirus	CaCV
	kalicivirus primatov	Primate Pan-1
	virus morskega leva San Miguel	SMSV-1
<i>Lagovirus</i>	virus zajčje hemoragične bolezni	RHDV/GH
	virus sindroma evropskega rjavega kunca	EBHS/GD
<i>Norovirus</i> (GGIII)	goveji črevesni virus – genotip 1	Bo/Jena/80/DE
	goveji črevesni virus – genotip 2	Bo/Newbury-2/76/UK
<i>Sapovirus</i> (GGIII)	prašičji črevesni virus	PEC

Večina živalskih kalicivirusov spada v rodova *Vesivirus* in *Lagovirus*, nekaj vrst pa najdemo tudi v rodovih *Norovirus* in *Sapovirus* (Green in sod., 2001). Virusi iz rodov *Vesivirus* in *Lagovirus* povzročajo predvsem sistemske okužbe, in ne črevesnih okužb. Nekaj primerov živalskih kalicivirusov pri različnih živalskih vrstah, ki jih je leta 1999 odobril ICTV (angl.: International Committee on Taxonomy of Viruses), prikazuje

preglednica 2.3 Nekateri od teh virusov niso specifični za določenega gostitelja in okužijo več vrst živali. Mačji kalicivirusi (angl.: Feline Calicivirus /FCV) lahko poleg mačk okužijo še pse in kojote, serološko pa so dokazali tudi okužbo pri ljudeh (USDA, 2003).

2.3 GENOM KALICIVIRUSOV

Genom človeških kalicivirusov je pozitivno polarna, enojnovijačna molekula RNA, ki ima na 3' koncu poliadenilno skupino (Clarke in Lambden, 1997). Zapis za nestrukturne proteine se nahaja na 5' koncu genoma, zapis za strukturne proteine pa na 3' koncu (Vinje in sod., 1997). Dolžina genoma je od 7400 do 7800 nukleotidov. Sestavljen je iz dveh ali treh odprtih bralnih okvirjev: ORF1, ORF2 in ORF3 (ang. ORF: Open Reading Frame). Genomi kalicivirusov iz različnih rodov se razlikujejo glede na razporeditev odprtih bralnih okvirjev (Green in sod., 2000).

2.3.1 Genom norovirusov in sapovirusov

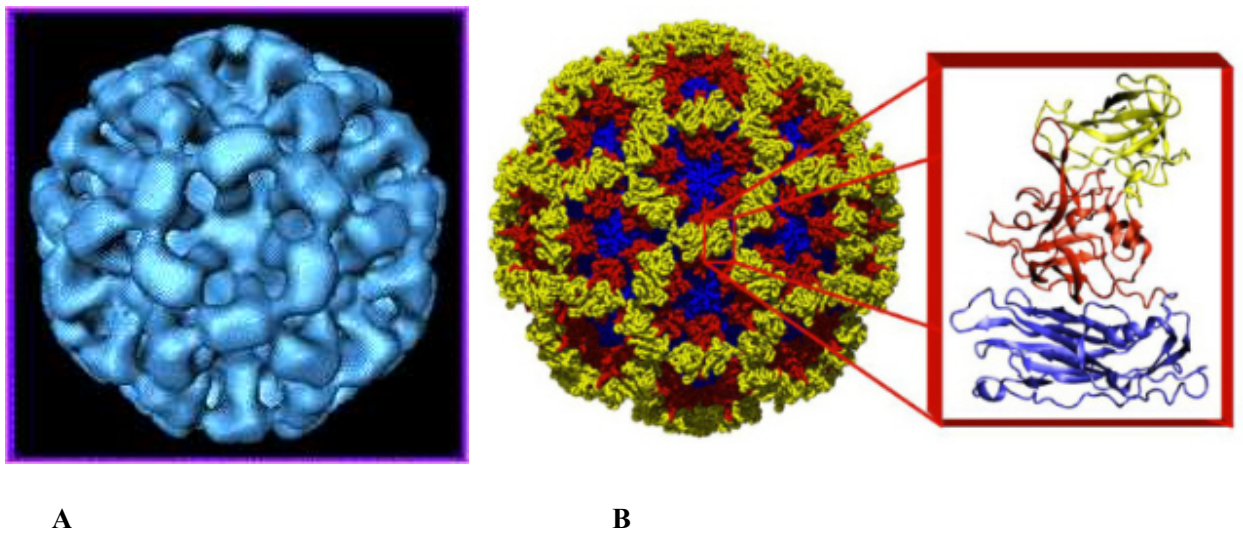
ORF1 norovirusov kodira nestrukturni poliprotein, dolg približno 1800 aminokislin s predvideno maso 193,5 kDa. Ohranjene regije poliproteina nakazujejo, da poliprotein sestoji iz helikaze, proteaze in od RNA odvisne polimeraze RNA. Vsi ti proteini so potrebni za razmnoževanje virusa. Poliprotein razreže proteaza, ki je eden od produktov poliproteina. Bralna okvirja ORF1 in ORF2 se prekrivata. Regija prekrivanja je pri norovirusih dolga 17 do 20 nukleotidov (odvisno od genske skupine). ORF2 nosi zapis za protein kapside viriona. Na zadnjem delu genoma je ORF3, ki s prvim nukleotidom začetnega kodona prekriva zadnji nukleotid končnega kodona ORF2 (Clarke in Lambden, 2000). ORF3 norovirusov kodira majhen protein, dolg 212 aminokislin. Predvidena molekulska masa je 22,5 kDa. Njegova funkcija ostaja še neznan. Rezultati nekaterih preiskav kažejo, da je tudi ta strukturni protein viriona (Glass in sod., 2000). Na koncu genoma norovirusov se nahaja 66 nukleotidov dolga nekodirajoča regija in poli-A rep. Organizacija genoma je nekoliko drugačna pri sapovirusih. Pri teh virusih je zapis za kapsido na ORF1 skupaj z zapisom za nestrukturne proteine. ORF1 je zato daljši in

zaseda večino genoma. ORF2 je na 3' koncu in kodira bazičen protein z neznano funkcijo (podobno kot ORF3 pri norovirusih) (Liu in sod. 1997).

Virusi iz rodov Lagovirus in Vesivirus imajo še subgenomsko RNA, ki je komplementarna 3' koncu ORF3. Ta prav tako nosi zapis za kapsidni protein (Meyers in sod., 1991).

2.4 STRUKTURA KALICIVIRUSOV

Ekspresijo kalicivirusnih genov so proučevali v celicah insektov, okuženih z bakulovirusnimi rekombinantami (Prasad in sod., 1999). Razmnoževanje človeških kalicivirusov v celičnih kulturah namreč do sedaj še ni bilo uspešno. V celicah insektov se kapsidni proteini samo-sestavijo v t.i. virusom podobne delce (ang. VLP: virus-like particles). Ti so antigensko in strukturno podobni nativnim virionom, zato so jih uporabili za pridobitev strukturnih, antigenških in bioloških informacij o kalicivirusih. Uporabili so krioelektronsko mikroskopijo in računalniško obdelavo slik (Bertolotti in sod., 2003). Ikozaedrično strukturo virusnih delcev sestavlja 180 kopij kapsidnega proteina. Te kopije se organizirajo v 90 dimerov, ki tvorijo ogrodje kapside. Na obodu kapside so značilne čašaste vdolbine, ki so najbolj vidne pri predstavnikih rodu Sapovirus. Te so družini *Caliciviridae* dale tudi ime (Slika 2.2).



Slika 2.2: Virus Norwalk – A: krioelektronska mikroskopska slika (Prasad in sod., 1999).
B: Računalniški prikaz strukture virusa Norwalk s kapsidnim proteinom (Prasad in sod., 1999).

2.5 RAZMNOŽEVANJE

Proučevanje razmnoževanja človeških črevesnih kalicivirusov je težavno zaradi nezmožnosti gojenja teh virusov v celičnih kulturah (Desselberger in sod., 2003). Sistemi gojenja v celičnih kulturah so razviti le za nekatere živalske kaliciviruse (Green in sod., 2001).

2.6 PATOGENEZA KALICIVIRUSNIH OKUŽB

Norovirusi in sapovirusi so povzročitelji epidemičnega gastroenteritisa pri ljudeh po vsem svetu. Povezujejo jih z izbruhi te bolezni pri vseh starostnih skupinah (Mingzhang in sod., 2003).

S človeškimi kalicivirusi se ljudje okužijo po oralni poti. Ker so virusi odporni na kislo okolje, preživijo v želodcu in potujejo do tankega črevesa, kjer se razmnožujejo (Caul, 1994). Večina znanja o patogenezi okužbe s človeškimi kalicivirusi temelji na študijah s

prostovoljci, izvedenih v ZDA, katerim so odvzeli biopsijske vzorce črevesa pred in po okužbi z virusom (Dolin in sod. 1975). Opravili so tudi študije na gnotobiotičnih prašičih. Prebavni trakt prašičev je namreč zelo podoben človeškemu in zato zelo primeren za tovrstne raziskave (Flynn in sod. 1988). Pri posameznikih s kliničnimi znaki so s svetlobno in elektronsko mikroskopijo opazili lezije na sluznici tankega črevesja. Notranja plast sluznice je bila vneta in epitelijske celice so se morfološko spremenile. Mikroskopsko so opazili skrajšanje mikrovilov, razširjanje endoplazemskega retikuluma, nabreklost mitohondrijev in znotrajcelične edeme. V dveh tednih po okužbi je tanko črevo ponovno dobilo normalen histološki videz (Agus in sod., 1973; Schreiber in sod., 1974; Lopman in sod., 2002).

2.7 PRENOS VIRUSOV IN KLINIČNI ZNAKI

Glavni znaki okužbe s človeškimi kalicivirusi so slabost, bruhanje in driska. Pojavijo se lahko tudi trebušni krči, mrzlica, bolečine v mišicah, glavobol in bolečine v grlu. Bolezen ima pogosto drugačen potek pri odraslih kot pri otrocih. Pri slednjih je bruhanje najpogostejši simptom, medtem, ko driska prevladuje pri odraslih. Inkubacijska doba je običajno od 1 do 3 dni. Simptomi trajajo dva do tri dni, pri imunsko oslabljenih lahko tudi dlje. Potek bolezni je običajno blag in bolezen sama zamre. Hospitalizacija in zdravljenje navadno nista potrebna (Kaplan in sod., 1982; Kapikian in sod., 1996).

Driska je eden glavnih znakov gastroenteritisa. Z njenim koncem lahko pričakujemo tudi iztek bolezni. Izločanje virusov se prične že en dan pred izbruhom bolezni in traja veliko dlje kot klinični znaki. V 30 % primerov oboleli izločajo viruse do tri tedne po okužbi (Koopmans in sod., 2004). Najvišji titri virusov v iztrebkih so v začetni fazi bolezni, tudi do 10^8 virusnih delcev na gram iztrebka. Klinični znaki in epidemiološke značilnosti so ključni za prepoznavanje okužbe (Kaplan in sod., 1982).

Virusi iz rodu *Vesivirus* niso črevesni patogeni, čeprav jih je možno osamiti tudi iz iztrebkov okuženih živali. Te viruse je mogoče gojiti tudi v celičnih kulturah. Virus vezikularnega eksantema (VESV) in virusi morskega leva San Miguel (SMSV)

povzročajo poškodbe na koži, ne razmnožujejo se pa pri prašičih ter morskih levih. Mačji in goveji kalicivirusi okužijo dihalne poti mačk in telet. Rod *Lagovirus* vključuje virus zajčje hemoragične bolezni (RHDV) ter virus sindroma evropskega rjavega kunca (EBHSV). Virus pri zajcih povzroči sistemske krvavitve in nekrozo jeter ter povzroča do 100 % smrtnost. (Guo in sod., 2003).

2.8 IMUNOST

V raziskavah, kjer so okužili prostovoljce, so ugotovili, da okužene osebe lahko razvijejo kratkotrajno imunsko zaščito, vendar le za ponovne okužbe z virusi sorodnega genotipa seva, ki so ga uporabili za primarno okužbo (Noel in sod., 1997; Jiang in sod., 1999). Dolgotrajna imunost se na človeške kaliciviruse ne razvije (Parrino in sod., 1977). Pri raziskavah na prostovoljcih so ugotovili, da nekateri ne razvijejo znakov okužbe ne pri prvi in ne pri drugi izpostavitvi virusu. Vzrok so verjetno razlike v lokalnem imunskem odzivu sluznice črevesa ali posebna genetska lastnost, npr. specifični receptor (Lopman in sod., 2002). Pri norovirusih je zaradi kratkotrajne imunske zaščite opazna visoka pojavnost in obolevnost pri zdravih odraslih osebah, tudi če je bila večina okužena že v otroštvu (Lopman in sod., 2002).

2.9 EPIDEMIOLOGIJA

Prenos človeških kalicivirusov med gostitelji poteka primarno z neposrednim stikom, kontaminirano hrano ter vodo. Pot okužbe je fekalno-oralna ali z aerosoli, ki se sproščajo ob bruhanju (Pether in Caul, 1983). Norovirusni izbruhi pogosto nastanejo kot posledica prenosov virusov z okuženih posameznikov na zdrave ljudi oziroma z zaužitjem z virusi kontaminirane hrane (školjk, sadja in zelenjave, pripravljenih delikates). Velikokrat povzroči izbruh tudi pitna voda, kontaminirana s fekalnimi odplakami, kot tudi uporaba vode v rekreativne namene (jezera in bazeni) (Lopman, 2002; Koopmans in Duizer, 2004). Zoonotski prenos okužbe še ni bil dokazan, čeprav podobnosti v nukleotidnih zaporedjih genomov živalskih in človeških kalicivirusov kažejo na to verjetnost (Lopman, 2002).

Norovirusi so v razvitem svetu vzrok za 68-80 % izbruhov gastroenteritisa. Nekatere ocene pa se povzpenjajo celo do 90 % (Duizer in sod., 2004). Delež izbruhov se spreminja iz leta v leto. V raziskavi, ki je vključevala tudi Slovenijo, so z zbranimi podatki o gastroenteritičnih epidemijah ugotovili, da se je leta 2002 število okužb, povzročenih z norovirusi, močno povečalo v primerjavi s prejšnjimi leti. (Lopman in sod., 2004). V štirih državah je bilo največ izbruhov v pomladanskih in poletnih mesecih tega leta, kar ni značilno za okužbe z norovirusi. Do povečanega števila epidemij in spremenjenega vzorca sezonskega pojavljanja gastroenteritisa, povzročenega z norovirusi je prišlo hkrati s pojavom novega seva znotraj genotipa 4 genske skupine II norovirusov (Lopman in sod., 2004; Poljšak-Prijatelj in sod., 2004).

Norovirusne okužbe prevladujejo v hladnejših mesecih, kot so ugotovili v raziskavi, kjer so preučili 12 izbruhov norovirusnih gastroenteritisov (Mounts in sod., 2000). Že leta 1929, ko je Zahorsky opisal epidemijo virusnega gastroenteritisa kot "zimsko bolezen z bruhanjem", je bilo jasno, da se kalicivirusne okužbe pojavljajo sezonsko. Na območju Evrope delež okužb začne naraščati v oktobru ali novembru, največ jih je v januarju, število pa se zmanjša v maju ali juniju (Vinje in sod.; 1997; Dedman in sod, 1998; Hedlund in sod., 2000; Koopmans in sod., 2000; Mounts in sod., 2000). Na Nizozemskem, v Nemčiji, na Finskem, v Angiji in Walesu pa so leta 2002 opazili spremenjen vzorec sezonskega pojavljanja kalicivirusnih okužb, saj je število epidemij prevladovalo v pomladanskih in poletnih mesecih (Lopman in sod., 2004). Okužbe z norovirusi v Sloveniji večinoma povzročajo sevi iz GGII. Največ epidemij je zabeleženih v zimskih mesecih, okužbe se pojavljajo predvsem pri otrocih do 2 let in osebah, starejših od 75 let (Kovač, 2005).

Večino okužb s človeškimi kalicivirusi pripisujejo norovirusom in sicer genski skupini II. (Fankhauser in sod., 1998; Smith in sod., 1999; Koopmans in sod., 2002).

2.10 DIAGNOSTIKA

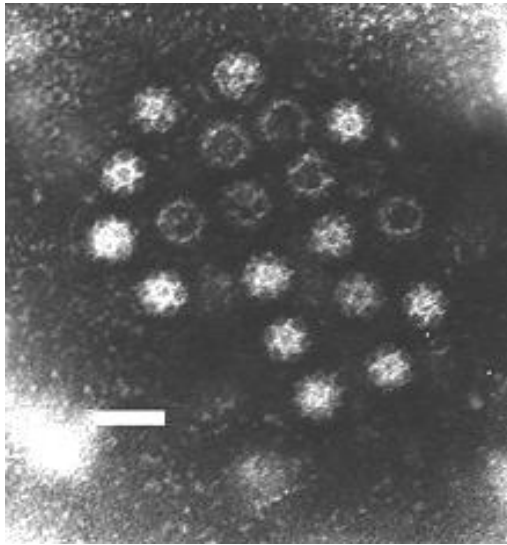
2.10.1 Elektronska mikroskopija

Dolgo časa je bila elektronska mikroskopija (EM) glavna metoda za diagnostiko kalicivirusnih okužb. Človeške kaliciviruse je namreč nemogoče gojiti v celičnih kulturah. Šele po uspešnem kloniranju genoma norovirusov so EM nadomestile molekularne metode, kot je RT-PCR. Te so postale tudi komercialno dostopne (Atmar in Estes, 2001).

Metoda negativnega kontrastiranja v elektronski mikroskopiji je bila temelj za dokazovanje kalicivirusnih okužb do 90. let prejšnjega stoletja. Težava je v tem, da je metoda relativno neobčutljiva, saj je za odkritje virusov v vzorcu potrebna zelo visoka koncentracija virusnih delcev, vsaj 10^6 virusnih delcev/ml iztrebka (Atmar in Estes, 2001). Kalicivirusi pa se v iztrebkih izločajo pogosto v nizkih koncentracijah - do 10^3 virusnih delcev/ml iztrebka. Zaradi tega so bili lažno negativni rezultati pogosti, saj je bilo dokazovanje virusov v iztrebku mogoče le do 48 ur po prenehanju kliničnih znakov bolezni.

Norovirusi nimajo značilne strukture, zato jih je težko ločiti od podobnih virusov z nejasno morfologijo (Atmar in Estes, 2001). Pri opazovanju kalicivirusov z značilno morfologijo, kot jo imajo sapovirusi, pa so lepo vidne čašaste vdolbine na obodu (Slika 2.3).

V Sloveniji je bila elektronska mikroskopija poglavitna metoda določanja kalicivirusnih okužb vse do leta 2000. Težava te metode je nizka občutljivost in s tem veliko število lažno negativnih rezultatov. Po uvedbi molekularnih metod (RT-PCR) se je število pozitivnih vzorcev povečalo, hkrati pa se je izboljšalo tudi razumevanje epidemiologije norovirusov (Poljšak-Prijatelj in sod., 2001a; Poljšak-Prijatelj in sod., 2001b).



A

B

Slika 2.3: **A:** Elektronsko mikroskopski posnetek sapovirusov v iztrebku bolnika z gastroenteritisom. Dobro so vidne vdolbine na obodu kapside. (Williams F.P., 2008). **B:** Elektronsko mikroskopski posnetek norovirusov. (IFREMER, 1994).

2.10.2 Encimsko imunska metoda

ELISA (encimsko imunski test) se uporablja za dokazovanje kalicivirusnih antigenov. Kljub temu, da je specifičnost testa visoka (98,3 %), je občutljivost nižja od molekularnih metod (55,5 %). Na tržišču sta le dva komercialno dostopna testa. Test IDEIATM Norovirus izdelovalca Oxoid (ZDA) in RIDASCREEN Norovirus izdelovalca Biopharm (Nemčija) (Richards in sod., 2003).

2.10.3 Molekularne metode

Za dokazovanje kalicivirusne RNA se uporablja verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). V primerjavi z elektronsko mikroskopijo je RT-PCR precej bolj občutljiva diagnostična metoda, ki omogoča določiti virusno RNA tudi dva tedna po okužbi in v nekaterih primerih še dlje (Parashar in sod., 1998). Za

nadaljnje povečanje občutljivosti so izdelali vgnezdno PCR. Z dvema paroma začetnih oligonukleotidov, pri katerih drugi par nalega znotraj dela genoma, pomnoženega v prvem krogu, se občutljivost lahko poveča za 10 do 1000 krat. Poveča se tudi specifičnost (Green in sod., 1993).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

3.1.1.1 Reagenti potrebni za osamitev RNA s Trizolom

- Trizol (Invitrogen)
- kloroform (Merck)
- 2-propanol (Merck)
- 75 % etanol, pripravljen iz absolutnega etanola (Merck)
- demineralizirana in destilirana sterilna voda brez ribonukleazne aktivnosti (ddH₂O) (Promega)
- epruvete MaXtract High Density (Qiagen) (2 ml)

3.1.1.2 Reagenti potrebni za reakcijo RT-PCR (Access RT-PCR System, Promega, ZDA)

- ddH₂O - voda brez ribonukleazne aktivnosti
- 5x AMV/*Tfl* reakcijski pufer
- MgSO₄, konc. 10 mM
- mešanica dNTP, konc. 10 mM
- AMV reverzna transkriptaza, konc. 5 U/μl
- *Tfl* DNA polimeraza, konc. 5 U/μl začetni oligonukleotidi za dokazovanje RNA norovirusov (JV12Y in JV13I)

3.1.1.3 Reagenti potrebni za reakcijo RT-PCR (Superscript Platinum one step RT-PCR kit, Invitrogen, ZDA)

- ddH₂O – voda brez ribonukleazne aktivnosti

- 2x reakcijska mešanica (pufer, dNTP)
- SuperscriptTM II RT/Platinum[®] Taq DNA polimerazna mešanica
- začetni oligonukleotidi za dokazovanje RNA sapovirusov (SR80 in JV33)

3.1.1.4 Reagenti potrebni za analizo PCR pridelkov v agaroznem gelu

- agaroz (Promega)
- TAE puferska raztopina (50 X)
 - tris baza (2 M)
 - očetna kislina (1 M)
 - EDTA (100 mM)
- etidijev bromid
- nanašalni pufer (6 X)
 - 40 % saharoza v 50 mM EDTA, pH 8
 - bromfenol modro
 - ksilen cianol
- označevalec molekularne mase DNA 100 bp (Promega)

3.1.2 Potrošni material

- steklene epruvete (10 ml)
- mikrocentrifugirke (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml) (Eppendorf)
- nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- merilni valji
- erlenmajerice
- staničevina
- zaščitne rokavice (Safeskin)

3.1.3 Laboratorijska oprema

- komora za varno delo (Iskra PIO)
- komora za varno delo (Iskra LVF9)
- centrifuga (Eppendorf centrifuge 5415R)
- ultracentrifuga (Beckman L8-80M Ultracentrifuge)
- mešalo vorteks (Tehtnica Železniki)
- stojalo za epruvete (Eppendorf)
- avtomatske pipete (0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 50-200 μ l, 10-1000 μ l, 100-1000 μ l) (Eppendorf)
- termopomnoževalnik GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems)
- tehtnica (Sartorius)
- mikrovalovna pečica MWG 729 (Clatronic)
- napajalnik za elektroforezo (LKB Bromma)
- kadička za elektroforezo (Biometra)
- UV transiluminator (LKB)
- kamera za snemanje agaroznih gelov Gel Doc 2000 (BIO-RAD)
- računalniški program za obdelavo slik gelov Quantity one (BIO-RAD)

3.2 METODE

3.2.1 Zbiranje in shranjevanje vzorcev

V obdobju od januarja do aprila 2004 smo na nekaterih slovenskih prašičjih farmah zbrali 220 iztrebkov zdravih prašičev (*Sus scropha*). Vzorce smo odvzeli enkrat mesečno. Vsakokrat smo naključno določili hlev iz katerega smo vzorčili. Odvzemanje vzorcev je bilo sistematično na takšnih odzemnih mestih, da je bila zajeta celotna površina hleva. V obdobju od oktobra 2004 do januarja 2005 smo zbrali še dodatnih 48 iztrebkov z nekaterih kmetij.

Znotraj hleva so bile živali razporejene v ogradah. V vsaki je bilo od pet do deset prašičev, ki so bili razvrščeni skupaj po starostnih skupinah: sesni (do 3 tednov), odstavljeni (od 3 do 10 tednov) in pitanci (več kot 10 tednov). Ograde so bile med seboj ločene s kovinskimi pregradami, ki so dopuščale tesen stik med posameznimi živalmi znotraj starostnih skupin. Takoj po odvzemu smo iztrebke shranili v epruvetah, jih postavili na led in jih prepeljali v laboratorij, kjer smo opravili testiranje.

Iztrebke v epruvetah smo razredčili v fosfatnem pufru približno 1:10 in odstranili trdne delce s centrifugiranjem pri 1600g za 20 minut. Pri nadaljnjem testiranju smo uporabili supernatant. Za dokazovanje norovirusne RNA smo združevali po pet supernatantov. Nadaljna obdelava je potekala z zbirami. Za dokazovanje sapovirusne RNA vzorcev nismo združevali. Sledilo je ultracentrifugiranje pri 110000g (32000 obratov/min) za 90 minut. Supernatant smo zavrgli in usedlino z morebitnimi virusnimi delci suspendirali v 0,5 ml pufra PBS. Do obdelave smo tako pripravljene vzorce shranili pri -80°C.

3.2.2 Osamitev RNA s Trizolom

Pri osamitvi RNA smo upoštevali priporočila za varno delo. Za izolacijo RNA smo uporabili modificirano metodo z reagentom TRIzol® proizvajalca Invitrogen (Chomczynski in sod., 1987).

Osamitev je potekala v komori za sterilno delo. Uporabljali smo materiale in opremo brez ribonukleazne aktivnosti. Nastavki za avtomatske pipete so imeli filtre, ki so preprečevali kontaminacijo pipet in vzorcev z RNA.

V epruvete smo odpipetirali po 250 µl vzorca in dodali 750 µl reagenta TRIzol®. Po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo dodali 200 µl kloroforma in dobro premešali na mešalu. Mešanico smo prenesli v epruvete MaXtract High Density (Qiagen) in inkubirali na sobni temperaturi 10 minut. Nato smo centrifugirali 5 minut pri 14000 g in 4°C. Gel v epruvetah je omogočil nastanek meje med zgornjo vodno in spodnjo organsko fazo. Vodno fazo z RNA smo prenesli v novo epruveto, dodali 500 µl

izopropanola, ohlajenega na -20 °C, ki je omogočil precipitacijo RNA, ter ju dobro premešali. Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo centrifugirali 10 minut pri 16000 g. Odlili smo supernatant in sprali RNA z 0,5 ml 75 % etanola, ohlajenega na -20 °C. Vsebino epruvet smo premešali na mešalu in centrifugirali 5 minut pri 9300 g. Ponovno smo odlili supernatant in posušili epruvete z RNA na dnu v komori za sterilno delo, nato pa smo RNA raztopili v 30 µl destilirane in demineralizirane sterilne vode brez ribonukleazne aktivnosti. Raztopljeno RNA smo shranili pri -70 °C.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

3.2.3.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (angl.: Polymerase Chain Reaction – v nadaljevanju PCR), je tehnika molekularne biologije, ki se uporablja za pomoževanje tarčnih odsekov nukleinskih kislin. Prvi jo je opisal Kary Mullis leta 1983 (Mullis in sod., 1986). PCR danes obstaja v mnogih različicah, ki se uporabljajo na več področjih molekularne biologije. V osnovi se metoda PCR izvaja v treh korakih (Remick in sod., 1990; Poljak in sod., 1994; Poljak, 1998).

3.2.3.2 Enostopenjska verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo

Po kloniranju genoma virusov Norwalk so razvili metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). V začetku so razvili začetne oligonukleotide, ki so prepoznavali omejeno število sevov kalicivirusov (Jiang in sod., 1992a, Ando in sod., 1995a; Ando in sod., 1995b). Čeprav je bila metoda zelo specifična, so kasneje razvili začetne oligonukleotide za bolj širok nabor sevov, saj je bilo ugotovljeno, da je družina *Caliciviridae* genetsko izjemno pestra (Green in sod., 1993). Večina široko specifičnih začetnih oligonukleotidov nalega na dobro ohranjene dele virusne RNA, ki kodirajo polimerazo. Za razlikovanje med genskimi skupinami pa se uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki so specifični za kapsidni del RNA.

Za izvedbo RT-PCR pri iskanju norovirusne RNA smo uporabljali reagente enostopenjskega komercialnega kompleta Access RT-PCR System proizvajalca Promega. Ta je vseboval reverzno transkriptazo virusa ptičje mieloblastoze (AMV, angl.: Avian Mieloblastosis Virus), DNA polimerazo *Tfl* osamljeno iz mikroorganizma *Thermus flavus*, deoksinukleotridifosfate ter pufer za reakcijsko mešanico. Za določanje norovirusov smo izbrali začetna oligonukleotida JV12Y in JV13I (Preglednica 3.1). Ta sta skupinsko značilna za človeške noroviruse in pomnožujeta 326 bp dolg odsek gena za od RNA odvisno polimerazo na ORF1 (angl.: open reading frame – odprt bralni okvir). Noroviruse smo določevali v vzorcih, ki smo jih zbrali v obdobju od januarja do aprila 2004.

Za dokazovanje sapovirusne RNA smo uporabili reagente komercialnega kompleta Superscript proizvajalca Invitrogen. Ta je vseboval encimsko mešanico Superscript™ z DNA polimerazo *Taq*, osamljeno iz mikroorganizma *Thermus aquaticus* in reakcijsko mešanico z dNTP. Za določanje sapovirusov smo izbrali začetna oligonukleotida SR80 in JV33 (Preglednica 3.2). Ta sta skupinsko značilna za človeške sapoviruse in pomnožujeta 319 bp dolg odsek gena za od RNA odvisno polimerazo na ORF1 (angl.: open reading frame – odprt bralni okvir).

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37 °C. Za pozitivne kontrole smo izbrali RNA iz vzorcev človeških iztrebkov. Vse pozitivne kontrole so bile potrjene s sekveniranjem.

Pred nastavitvijo programa za RT-PCR smo vzorčne RNA in kontrole z reverznimi začetnimi oligonukleotidi denaturirali pri 90°C 5 minut. Postopek smo izvedli na sledeč način: v pripravljene in označene 0,2 ml epruvete smo odpipetirali po 1 µl reverznega začetnega oligonukleotida JV13I (norovirusi) (preglednica 3.1) oziroma JV33 (sapovirusi) (preglednica 3.2) s koncentracijo 50 pmol/µl in 5 µl 10x z ddH₂O redčene vzorčne RNA. Za negativno kontrolo smo uporabili 5 µl ddH₂O. Za pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec RNA, ki je bil predhodno potrjen s sekveniranjem.

Preglednica 3.1: Nukleotidni zaporedji in mesti prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov JV12Y in JV13I (Vennema in sod., 2002).

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'→3'	Mesto prileganja
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 – 4572
JV13I	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878

I – inozin (dovoljuje parjenje z vsemi štirimi bazami)

Y – C/T

Preglednica 3.2: Nukleotidni zaporedji in mesti prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov SR80 in JV33 (Vinjé in sod., 2000).

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'→3'	Mesto prileganja
SR80	TGGGATTCTACACAAAACCC	4366-4385
JV33	GTGTANATGCARTCATCACC	4666-4685

Tako pripravljene mikrocentrifugirke smo vstavili v termopomnoževalnik na denaturacijski program. Med potekom denaturacije smo pripravili reakcijsko mešanico.

Reakcijska mešanica za en vzorec (44 µl) za dokazovanje norovirusne RNA je vsebovala:

- 28 µl ddH₂O
- 10 µl 5x AMV/*Tfl* pufra
- 2 µl 25 mM MgSO₄
- 1 µl 10 mM dNTP mix
- 1 µl začetnega oligonukleotida JV12Y s koncentracijo 50 pmol/µl
- 1 µl encima AMV reverzne transkriptaze (5 U/µl)
- 1 µl encima *Tfl* DNA polimeraze (5 U/µl)

Reakcijska mešanica za en vzorec (50 µl) pri dokazovanju sapovirusne RNA je vsebovala:

- 17 µl ddH₂O
- 25 µl reakcijske mešanice (dNTP mix, MgSO₄)
- 1 µl začetnega oligonukleotida SR80 s koncentracijo 50 pmol/µl
- 1 µl RT/Platinum[®] Taq DNA Mix

Reakcija PCR se je pričela z reverznim prepisom RNA v cDNA. Reverzni prepis je potekal 30 minut pri 45 °C. Zatem smo reakcijsko mešanico segreli na 94°C za dve minuti. To je omogočilo inaktivacijo reverzne transkriptaze in razdvajanje RNA - cDNA. Sledilo je 40 temperaturnih ciklov, kot so navedeni v preglednici 3.3 za pomnoževanje norovirusne RNA in preglednici 3.4 za pomnoževanje sapovirusne RNA.

Preglednica 3.3: Časovni in temperaturni potek verižne reakcije s polimerazo pri pomnoževanju norovirusne RNA.

Čas	Temperatura	Del cikla
30 sekund	94 °C	denaturacija RNA - cDNA
1 minuta	37 °C	prileganje začetnih oligonukleotidov
2 minuti	68 °C	podaljševanje začetnih oligonukleotidov

Preglednica 3.4: Časovni in temperaturni potek verižne reakcije s polimerazo pri pomnoževanju sapovirusne RNA.

Čas	Temperatura	Del cikla
15 sekund	94 °C	denaturacija RNA - cDNA
30 sekund	37 °C	prileganje začetnih oligonukleotidov
1 minuta	72 °C	podaljševanje začetnih oligonukleotidov

Cikel se je zaključil s sedem-minutnim končnim podaljševanjem pri 68 °C in ohlajanjem reakcijske mešanice na 4 °C. Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C.

3.3.3 Analiza pridelkov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Za analizo pridelkov PCR smo uporabili elektroforezo. Uporabili smo 2 % agarozni gel, pripravljen iz 1 g agaroze in 50 ml TAE pufra (Tris-acetat EDTA). Agarozo smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Potem, ko se je agarozna raztopila, smo gel nekoliko ohladili ter dodali 5 µl etidijevega bromida v koncentraciji 5 mg/ml. Etidijev bromid se vrine v dvojno vijačnico DNA. Ob osvetlitvi z UV lučjo močno fluorescira in tako omogoča detekcijo pridelkov PCR. Gel smo nato vlili v kadičko za elektroforezo in z glavnički oblikovali vdolbine za nanašanje vzorcev.

15 μ l vzorca smo zmešali s 3 μ l nanašalnega pufra in 15 μ l mešanice nanесли v vdolbinice v gelu. V gel smo nanесли tudi 3 μ l molekularnega označevalca DNA. Po nanosu smo kadičko z gelom priklopili na napajalnik ter napetost nastavili na 90 V. Elektroforezo smo pustili teči 45 minut.

Po 45 minutah smo gel prenesli v komoro z ultravijolično svetilko ter pregledali rezultate. Pri pregledovanju rezultatov smo uporabljali komercialni program GelDoc (Biorad).

4 REZULTATI

4.1 ZNAČILNOST VZORCEV

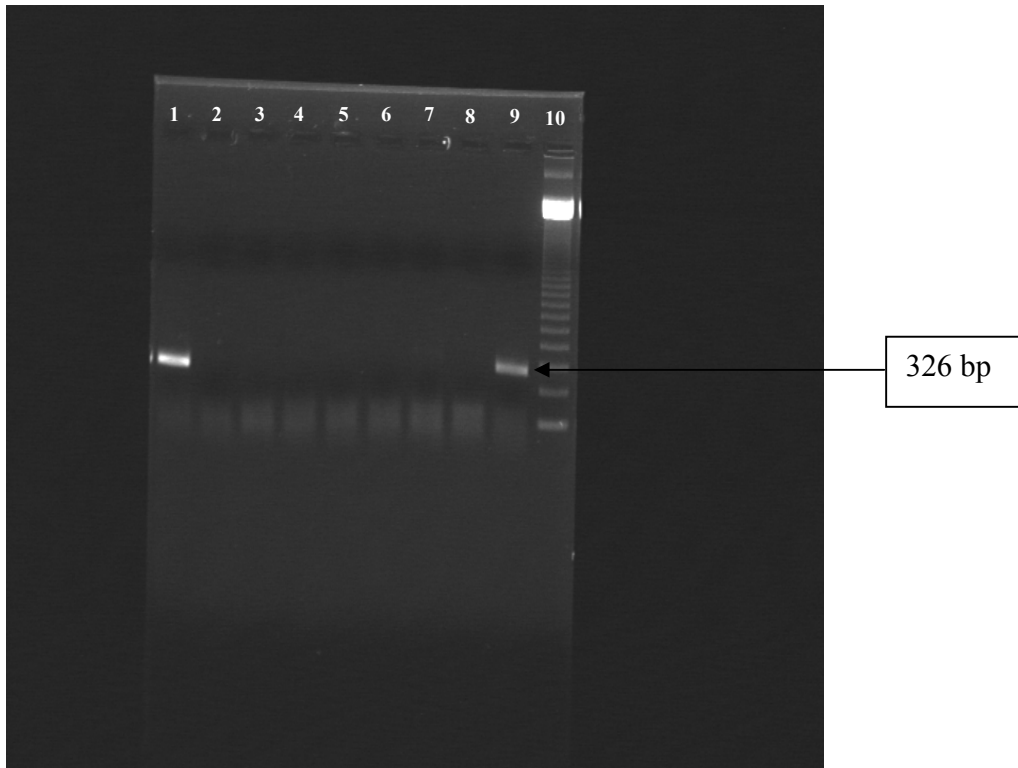
Skupno smo pregledali 268 prašičjih iztrebkov zdravih živali z nekaterih farm oziroma kmetij v Sloveniji. Vzorce, odvzete od januarja do aprila 2004, smo združevali po pet skupaj. Združevali smo le vzorce enakih starostnih skupin. To pomeni, da smo imeli 44 zbirov (Preglednica 4.1). Starost prašičev je bila od nekaj dni do enega leta.

Preglednica 4.1: Število združenih vzorcev iztrebkov prašičev pregledanih na noroviruse.

Starost prašičev	Število vzorcev
Sesni	13
Odstavljenci	16
Pitanci	15
Skupaj	44

4.2 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA NOROVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma JV12Y/JV13I

S parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I smo pomnoževali 326 bp dolg odsek norovirusnega genoma (slika 4.1). Pri 8 (18 %) vzorcih od skupno 44 smo določili norovirusno RNA. Najmanjši delež pozitivnih vzorcev smo zasledili pri skupinah sesnih in pitanih prašičev, kjer smo v vsaki skupini dokazali RNA norovirusov le pri enem prašiču. Pri odstavljenih smo dokazali norovirusno RNA v združenih vzorcih v februarju štiri (80 %) in v marcu dva (67 %) (slika 4.2).

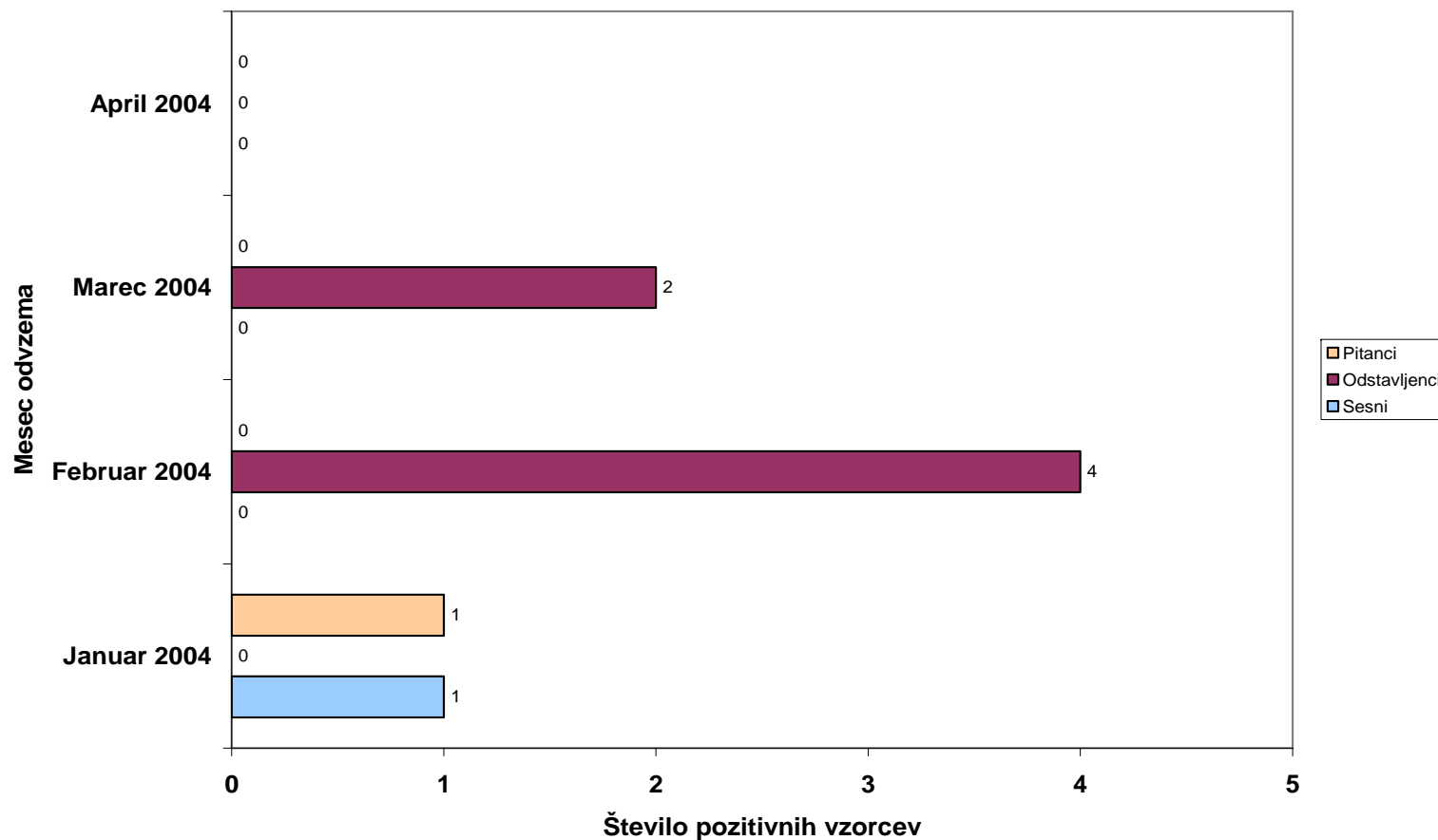


Slika 4.1: Agarozni gel z vzorci pomnoženega tarčnega odseka genoma norovirusov s parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I. Pozitiven rezultat je 326 bp velik pridelek pomnoževanja.

Legenda:

- 1 → 7 vzorci
- 8 - negativna kontrola
- 9 - pozitivna kontrola
- 10 – molekularni označevalec (100 bp)

Število pozitivnih vzorcev po mesecih (norovirusna RNA)



Slika 4.2: Rezultati pomnoževanja polimeraznega dela genoma norovirusov s parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I v iztrebkih sesnih, odstavljenih in pitanih prašičev (rezultati so predstavljeni kot absolutno število vzorcev v vsakomesečnem vzorčenju).

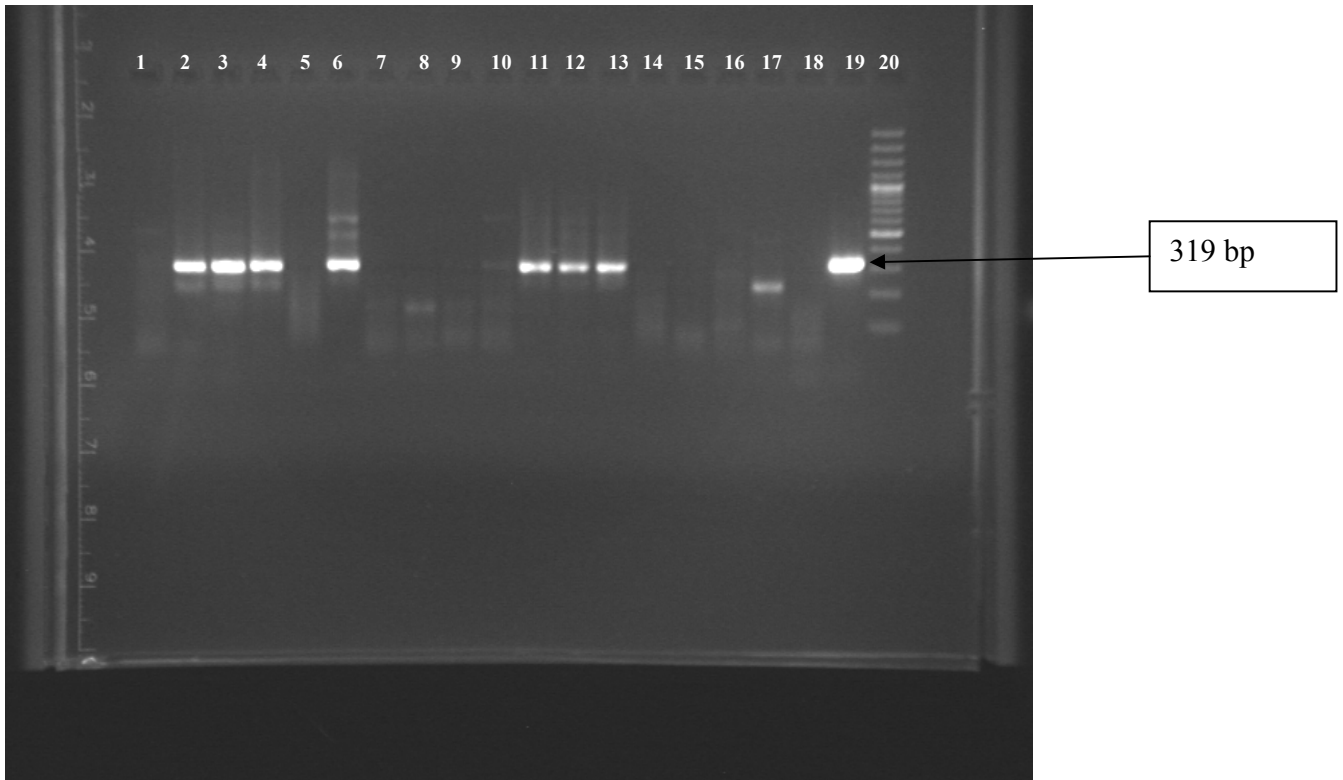
4.3 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA SAPOVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma SR80/JV33

Zaradi majhnega števila pozitivnih vzorcev in velikega števila nespecifičnih vezav začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I pri določanju norovirusne RNA smo se odločili, da pri določanju sapovirusne RNA vzorcev ne bomo združevali. Sapovirusno RNA smo iskali v 92 nezdruženih vzorcih (Preglednica 4.2).

S parom začetnih oligonukleotidov SR80/JV33 smo pomnoževali 319 bp dolg odsek sapovirusnega genoma (slika 4.3). Pri 37 (40 %) vzorcih od skupno 92 smo določili sapovirusno RNA. Sapovirusno RNA smo določili pri sedmih vzorcih pitanih prašičev in devetih vzorcih sesnih prašičev. Pri odstavljenih smo dokazali norovirusno RNA v 20 vzorcih, največ decembra in januarja. (slika 4.4).

Preglednica 4.2: Število vzorcev iztrebkov prašičev pregledanih za sapoviruse glede na starost živali

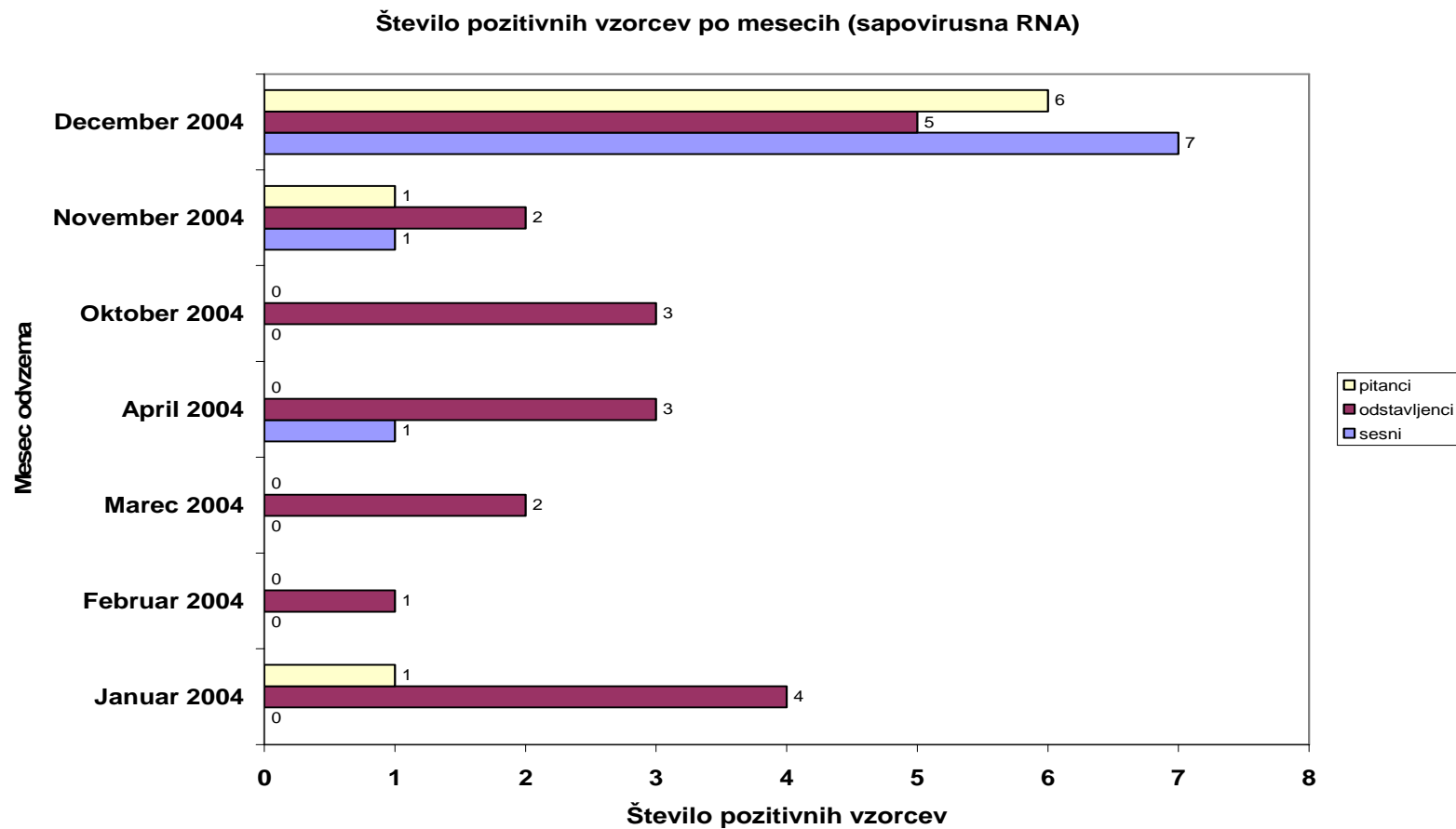
Starost prašičev	Število vzorcev
Sesni	35
Odstavljenci	30
Pitanci	27
Skupaj	92



Slika 4.3: Agarozni gel z vzorci pomnoženega tarčnega polimeraznega odseka genoma sapovirusov s parom začetnih oligonukleotidov SR80/JV33. Pozitiven rezultat je 319 bp dolg pridelek pomnoževanja.

Legenda:

- 1 → 17 vzorci
- 18 – negativna kontrola
- 19 – pozitivna kontrola
- 20 – molekularni označevalec (100 bp)



Slika 4.4: Rezultati pomnoževanja polimeraznega odseka genoma sapovirusov s parom začetnih oligonukleotidov SR80/JV33 v iztrebkih sesnih, odstavljenih in pitanih prašičev (rezultati so predstavljeni kot absolutno število vzorcev v vsakomesečnem vzorčenju).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V raziskavi smo v iztrebkih zdravih prašičev v obdobju od januarja do decembra 2004 določali norovirusno in sapovirusno RNA z metodo RT-PCR.

Skupno je bilo odvzetih 268 vzorcev. Vzorce, odvzete v spomladanskem obdobju, smo smiselno združili v 44 zbirov. Norovirusno in sapovirusno RNA smo zasledili pri vseh starostnih skupinah prašičev (sesnih, odstavljenih in pitancih), največkrat pri odstavljenih. Ugotovitev povezave med pojavnostjo norovirusov pri prašičih in morebitnim prenosom na ljudi je pomembna z vidika zaščite ciljne skupine bolnikov (Wang in sod., 2005). Večjo pojavnost pri odstavljenih v nekaterih raziskavah povezujejo s preselitvijo sesnih prašičev v večje ograde z večjo koncentracijo živali. To povzroči stres, ki lahko pomembno vpliva na občutljivost živali na različne patogene organizme (Martella in sod., 2008).

V zadnjem času je bilo objavljenih več publikacij o povečani pojavnosti sapovirusov pri prašičih (Martella in sod., 2008; Jeong in sod., 2007), zato smo se odločili, da v zbranih vzorcih poskusimo dokazati tudi sapovirusno RNA. Pokazalo se je, da je prevalenca sapovirusov podobna prevalenci norovirusov. Sapovirusno RNA smo našli v 35 od skupno 92 vzorcev (38 %).

Za detekcijo norovirusne RNA smo uporabili začetna oligonukleotida JV12Y/JV13I. Pri nekaterih vzorcih smo dobili nespecifične produkte. To je verjetno posledica dokaj nizke temperature (37°C) prileganja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali pri raziskavi. Pri nekaterih študijah, kjer so uporabljali enak par začetnih oligonukleotidov, je bilo kar 48 % produktov nespecifičnih (van der Poel in sod., 2000). Vendar pa ocenjujemo, da to ni vplivalo na verodostojnost dobljenih rezultatov. Zaradi velikega števila nespecifičnih produktov, dobljenih tudi v naših poskusih, smo se odločili, da pri dokazovanju sapovirusne RNA vzorcev ne bomo združevali v zbirne.

Iztrebki so bili odvzeti živalim, brez kliničnih znakov bolezni. Ugotavljanje prekuženosti brez vidnih kliničnih znakov je pomembno pri ugotavljanju perzistence teh virusov saj se v naravi pojavljajo novi sevi, ki bi se lahko prenašali tudi na človeka. Norovirusi namreč, tako kot vsi RNA virusi, niso homogen rod, temveč združba bližje sorodnih mutant in rekombinant poimenovanih kvazi-vrste (angl.: quasispecies). Te so med virusnim pomnoževanjem nenehno podvržene genetski variaciji, kompeticiji in selekciji. Ko se združba virusov pomnožuje, se pomnožuje tudi število virusnih genomov z mutiranimi regijami. To povečuje možnost za pojav novih sevov s spremembami v celičnem tropizmu in možnostjo razmnoževanja v novih gostiteljskih celicah (Cheol in sod., 2007).

Največkrat smo dokazali RNA norovirusov v vzorcih prašičev, zbranih v mesecu februarju. Meseca marca je bilo pozitivnih vzorcev manj, medtem ko v aprilu norovirusne RNA v vzorcih nismo več dokazali. RNA sapovirusov smo največkrat dokazali decembra in januarja. Do aprila je število pozitivnih vzorcev že upadlo. V zimskih mesecih je tudi pri ljudeh obolenje povzročeno s kalicivirusi pogostejše. Ta skladnost nakazuje na verjetno možnost zoonotskega prenosa med živalmi in človekom čeprav je razlag za pogostejše obolenje pozimi več. Med drugim tudi boljša obstojnost kalicivirusov v zimskih razmerah in posledično obsežnejšim kroženjem virusa v populaciji. Izključena ni niti možnost prenosa virusa z ljudi na živali.

Zoonotski prenos z živali na človeka bi bilo potrebno dokazati z dodatnimi raziskavami, predvsem s sekveniranjem pomnoženega virusnega genoma in primerjavo le tega z genomi kalicivirusov, ki dokazano povzročajo bolezen pri človeku. Občutljivost metode bi lahko izboljšali z uporabo nekaterih drugih začetnih oligonukleotidov. Domnevamo namreč, da je med našimi rezultati tudi nekaj lažno negativnih. Par začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I ima namreč več mest neujemanja s tarčnim zaporedjem. To je verjetno eden od razlogov za nizko občutljivost pri detekciji norovirusov v iztrebkih prašičev.

V nadaljnih raziskavah bi bilo smiselno naključno zbiranje iztrebkov zdravih in bolnih prašičev z večjega števila farm razporejenih po celotni površini Slovenije, kot tudi vključiti v raziskavo druge domače živali: govedo, pse, mačke in kunce, ki so morebiten rezervoar norovirusov in sapovirusov (Bridger, 1990). S podaljšanjem raziskave na obdobje 12 mesecev ali celo dlje, bi pridobili boljši vpogled v pojavnost norovirusov pri prašičih na farmah in kmetijah v Sloveniji. Majhnost našega vzorca namreč zmanjša njegovo reprezentativnost in možnost posplošitve na razmere v celotni Sloveniji ali širšem prostoru.

5.2 SKLEPI

V pričujoči raziskavi smo potrdili hipotezo o navzočnosti norovirusne in sapovirusne RNA v iztrebkih prašičev, odvzetih na nekaterih slovenskih farmah in kmetijah. Ta ugotovitev nakazuje možnost, da so prašiči lahko potencialen rezervoar teh virusov, odkoder bi se potencialno lahko prenesli tudi na ljudi. Za dokaz zoonotskega prenosa bi bilo potrebno opraviti še dodatne študije. Dokaz o omenjenem prenosu bi zahteval večjo pozornost in sprožil morebitno potrebo po povišanju higienskih standardov na farmah. Problem potencialnega zoonotskega prenosa je znatno večji v nerazvitih državah, kjer je stikov med živalmi in ljudmi več kot pri nas in ima lahko gastroenteritis hujše posledice zaradi neustrezne zdravstvene oskrbe.

6 POVZETEK

Kalicivirusi so eden glavnih povzročiteljev nebakterijskega gastroenteritisa v Sloveniji in po svetu. Bolnišnice, domovi za ostarele in vsa druga okolja, kjer so ljudje v tesnem stiku, so še posebej izpostavljeni. Največ epidemij z norovirusi se pripeti zaradi okužbe s hrano in vodo. Virus se prenaša po fekalno-oralni poti in je zelo nalezljiv zaradi nizkega infektivnega odmerka. Bolezen povzročata dva rodova družine *Caliciviridae* in sicer norovirusi in sapovirusi.

Rezervoar kalicivirusov še ni znan. Eden od možnih rezervoarjev so tudi živali, še posebej govedo in prašiči. Da bi ocenili možnost prenosa virusov z živali na človeka, smo zbrali vzorce z nekaterih slovenskih farm prašičev in z molekularnimi metodami določili noroviruse in sapoviruse v iztrebkih zdravih živali.

V iztrebkih smo z metodo RT-PCR pomnoževali tarčne odseke polimeraznega dela virusne RNA. Za iskanje norovirusov smo uporabili začetna oligonukleotida JV13I in JV12Y, za iskanje sapovirusne RNA pa začetna oligonukleotida SR80 in JV33. Norovirusno RNA smo iskali v skupno 44 zbiri. Zaradi velikega števila nespecifičnih pridelkov PCR smo se odločili, da pri iskanju sapovirusne RNA vzorcev ne bomo združevali. Norovirusno in sapovirusno RNA smo potrdili pri vseh starostnih skupinah prašičev. Največ pozitivnih vzorcev smo zasledili v zimskih mesecih. Norovirusno RNA smo našli pri osmih zbiri od skupno 44, sapovirusno RNA pa smo našli pri 35 vzorcih od skupno 92.

Rezultati, ki smo jih dobili, so skladni z rezultati drugih raziskav, kjer so prav tako določili človeške kaliciviruse v iztrebkih farmskih živali (van der Poel in sod., 2000).

7 VIRI

- Ando T., Mulders M.N., Lewis D.C., Estes M.K., Monroe S.S., Glass R.I. 1994. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strains previously classified in three serotypes by solid-phase immune electron microscopy. *Archives of Virology*, 135: 217-226
- Ando T., Jin Q., Gentsch J.R. 1995. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *Journal of Medical Virology*, 47: 145-152
- Ando T., Noel J.S., Fankhauser R.L. 2000. Genetic classification of »Norwalk-like viruses«. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 2: S336-S348
- Agus S.G. , Dolin R., Wyatt R.G., Tousimis A.J., Northrup R.S. 1973. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Annals of Internal Medicine*, 79: 18-25
- Atmar R.L., Estes M.K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 446-446.
- Bertolotti C.A., Chen R., Estes M.K., Prasad V. 2003. Structure of Norwalk virus: the prototype human calicivirus. V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J.(eds.). Amsterdam, Elsevier: 455-465
- Bridger J.C. 1990. Small viruses associated with gastroenteritis in animals. V: Saif L.J., Theil K.W. (eds.). *Viral diarrheas of man and animals*. Boca Raton, CRC Press: 161-182
- Burroughs J.N. , Brown F. 1974. Physico-chemical evidence for re-classification of the caliciviruses. *Journal of General Virology*, 22: 281-286

- Burroughs J.N., Brown F. 1978. Presence of covalently linked protein on caliciviral RNA. *Journal of General Virology*, 41: 443-446
- Caul E.O. 1994. Small round structured viruses – airborne transmission and hospital control. *Lancet*, 343: 1240-1242
- Cheol J., Sang-Ik P., Sung-Hee P., Ha-Hyun K., Su-Jin P., Jae-Ho J., Hyon E.C., Saif L.J., Sang-Ki K., Mun-Il K., Bang-Hun H., Kyoung-Oh C. 2007 Genetic diversity of porcine sapoviruses. *Veterinary Microbiology*, 122: 246-257
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159
- Clarke I.N., Lambden P.R., Caul E.O. 1997. Human enteric RNA viruses: caliciviruses and astroviruses. V: *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. Mahy B.W.J., Collier L. (eds.). London, Arnold: 511-35
- Clarke I.N., Lambden P.R. 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 2: S309-S316
- Dedman D., Laurichesse H., Caul E.O., Wall P.G. 1998. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-1995. *Epidemiology and Infection*, 121: 139-149
- Desselberger U., Gray J. 2003. Norwalk- and Sapporo-like viruses (human caliciviruses). V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 447-453

- Dolin R., Levy A.G., Wyatt R.G., Thornhill T.S., Gardner J.D. 1975. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. *American Journal of Medicine*, 59: 761-768
- Duizer E., Bijkerk P., Rockx B., de Groot A., Twisk F., Koopmans M. 2004. Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4538-4543
- Fankhauser R.L., Noel S.J., 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
- Farkas T., Zhong W.M., Jing Y., Huang P.W., Espinosa S.M., Martinez N., Morrow A.L., Ruiz-Palacios G.M., Pickering L.K., Jiang X. 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology*, 149: 1309-1323
- Fastier L. B. 1957. A new feline virus isolated in tissue culture. *American Journal of Veterinary Research*, 18: 382-389
- Flynn W.T., Saif L.J., Moorhead P.G. 1988. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus in four day old gnotobiotic piglets. *American Journal of Veterinary Research*, 49: 819-825
- Glass P.J., White L.J., Ball J.M., Lepare-Goffart I., Hardy M.E., Estes M.K. 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *Journal of Virology*, 74: 6581-6591
- Green K.Y., Lew J.F., Jiang X., Kapikian A.Z., Estes M.K. 1993. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2185-2191

- 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 Caliciviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 2: S322-S330
- Green K.Y., Chanock R.M., Kapikian A.Z. 2001. Human caliciviruses. V: *Fields virology*. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincot Williams & Wilkins: 841-847
- Guo M., Saif L.J. 2003. Pathogenesis of enteric calicivirus infections. V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 489-503
- Han M.G., Smiley J.R., Thomas C., Saif L.J. 2004. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 5214-5224
- Hardy M.E., Estes M.K. 1996. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes*, 12: 287-290
- Hedlund K.O., Rubilar-Abreu E., Svensson L. 2000. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 2: S275-S280
- IFREMER – French Research Institute for Exploitation of the Sea. 1994. Microbial contamination from human and agricultural waste discharges. Pariz, IFREMER – French Research Institute for Exploitation of the Sea, Veterinary Sciences Division
http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/microbio/micro-c1_gb.htm
(junij, 2008): 1 str.
- Jeong C., Park S.I., Park S.H., Kim H.H., Park S.J., Jeong J.H., Choy H.E., Saif L.J., Kim S.K., Kang M.I., Hyun B.H., Cho K.O. 2007. Genetic diversity of porcine sapoviruses. *Veterinary Microbiology*, 122: 246-257

- Jiang X., Zhong W., Kaplan M., Pickering L.K., Matson D.O. 1999. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *Journal of Virological Methods*, 78: 81-91
- Kapikian A.Z., Estes M.K., Chanock R.M. 1996. Norwalk group of viruses. V: *Fields virology*. 3rd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B., Straus S.E. (eds.). Philadelphia, New York, Lippincott-Raven Publishers: 783-810
- Kapikian A. Z., Wyatt R. G., Dolin R., Thornhill T. S., Kalica A. R., Chanock R. M., Kim H. W. 1972. Visualisation by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10: 1075-1081
- Kaplan J.E., Feldman R., Campbell D.S., Lookabaugh C., Gary G.W. 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *American Journal of Public Health*, 72: 1329-1332
- Koopmans M., Vinje J., de Wit M., Leenen I., van der Poel W., van Duynhoven Y. 2000. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S262-269
- Koopmans M., van Strien E., Vennema H. 2002. Molecular epidemiology of human caliciviruses. V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 509-540
- Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 23-41

- Kovač K. 2005. Molekularno določanje človeških kalicivirusov v iztrebkih bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 65 str.
- Lambden P.R., Caul E.O., Ashley C.R., Clarke I.N. 1994. Human enteric caliciviruses are genetically distinct from small round structured viruses. *Lancet*, 343: 666-667
- Liu B.L., Clarke I.N., Caul E.O., Lambden P.R. 1995. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from Norwalk-like viruses. *Archives of Virology*, 140: 1345-1356
- Liu B.L., Clarke I.N., Caul E.O., Lambden P.R. 1997. The genome 5' terminus of Manchester calicivirus. *Virus Genes*, 15: 25-28
- Lopman B.A., Brown D.W., Koopmans M. 2002. Human caliciviruses in Europe. *Journal of Clinical Virology*, 24: 137-160
- Lopman B., Vennema H., Kohli E., Pothier P., Sanchez A., Negrodo A., Buesa J., Schreier E., Reacher M., Brown D., Gray J., Iturriza M., Gallimore C., Bottiger B., Hedlund K.O., Torven M., von Bonsdorff C.H., Maunula L., Poljsak-Prijatelj M., Zimsek J., Reuter G., Szücs G., Melegh B., Svennson L., van Duynhoven Y., Koopmans M. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 363: 682-688
- Martella V., Banyai K., Lorusso E., Bellacicco A.L., Decaro N., Mari V., Saif L., Constantini V., De Grazia S., Pezzotti G., Lavazza A., Buonavoglia C. 2008. Genetic heterogeneity of porcine enteric caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. *Virus Genes*, 36: 365-373
- Mayo M.A. 2002. A summary of taxonomic changes, recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 147: 1655-1663

- Meyers G., Wirblich C., Thiel H.J. 1991. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology*, 184: 677-86
- Mingzhang G, Saif L.J. 2003. Pathogenesis of enteric calicivirus infections. *Viral Gastroenteritis*, 45: 489-503
- Mounts A.W., Ando T., Koopmans M., Bresee J.S., Noel J., Glass R.I. 2000. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 2: S284-S287
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., and Erlich, H.A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273
- Nakata S., Chiba S., Terashima I.I., Nakao T. 1985. Humoral immunity in infants with gastroenteritis caused by human human calicivirus. *Journal of Infectious Diseases*, 152: 274-279
- Noel J.S., Ando T., Leite J.P., Green K.Y., Dingle K.E., Estes M.K., Seto Y., Monroe S.S., Glass R.I. 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *Journal of Medical Virology*, 53: 372-383
- Pang X.L., Honma S., Nakata S. Vesikari T. 2000. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 2: S288-S294

- Parashar U.D., Dow L., Fankhauser R.L., Humphrey C.D., Miller J., Ando T., Williams K.S., Eddy C.R., Noel J.S., Ingram T., Bresse J.S., Monroe S.S., Glass R.I. 1998. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiology and Infection*, 121: 615-621
- 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
- Pether J.V., Caul E.O. 1983. An outbreak of food-borne gastroenteritis in two hospitals associated with a Norwalk-like virus. *Journal of Hygiene (London)*, 91: 343-350
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400
- Poljak M. 1998. Molekularno dokazovanje virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, *Medicinski razgledi*: 129-142
- Poljšak-Prijatelj M., Frelj T., Zimšek J., Berce I., Barlič-Maganja D. 2001a. Kalicivirusi – povzročitelji epidemičnega gastroenteritisa pri otrocih v vrtcu – izkušnje v Sloveniji. *Zdravniški vestnik*, 70: 619-622
- Poljšak-Prijatelj M., Zimšek J., Bufon T., Barlič-Maganja D., Frelj T. 2001b. Molecular detection and epidemiology of Norwalk-like viruses in Slovenia in 2000-2001. V: *Abstracts of the 5th Annual Meeting of ESCV*. Lahti, 2-5th Sept., 2001. Lahti, European Society for Clinical Virology: 196-196
- Poljšak-Prijatelj M., Zimšek J., Hočvar Grom A., Barlič-Maganja D. 2004. Norovirus associated outbreaks of gastroenteritis in homes for the elderly in Slovenia in the winter season 2002-2003. V: *Second European Congress of Virology Eurovirology*

2004. Madrid, 5-9th Sept., 2004. Madrid, Medicine Faculty of the Complutense University: 103-103
- Prasad B.V.V., Hardy, Estes M.E. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286: 287-290
- Pringle C.R. 1998. Virus taxonomy – San Diego 1998. *Archives of Virology*, 143: 1449-1459
- Reimann H.A., Price A.H., Hodges J.H. 1945. The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery?). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 59: 8-9
- Remick D.G., Kunkel S.L., Holbrook E.A., Hanson C.A. 1990. Theory and applications of the polymerase chain reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, 93: 49-54
- Richards A.F., Lopman B., Gunn A., Curry A., Ellis D., Cotterill H., Ratcliffe S., Jenkins M., Appleton H., Gallimore C.I., Gray J.J., Brown D.W.G. 2003. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *Journal of Clinical Virology*, 26: 109-115
- Schreiber D.S., Blacklow N.R., Trier J.S. 1974. The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 129: 705-708
- Smith T.K., Bos P., Peenze I., Jiang X., Estes M.K., Steele A.D. 1999. Seroepidemiological study of genogroup I and II calicivirus infections in South and southern Africa. *Journal of Medical Virology*, 59: 227-231
- Snyder J. D., Merson M.H. 1982. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bulletin WHO*, 60: 605-613

- Traum J. 1936. Vesicular exanthema of swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 88: 316-327
- USDA - The US Department of Agriculture. 2003. *Caliciviruses of animals*. Washington, USDA - The US Department of Agriculture, Veterinary Services
http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/taf/emerginganimalhealthissues_files/calicivirusespaperreg.pdf (junij 2008): 11 str.
- Van der Poel W.H.M., Vinje J., van der Heide R., Herrera M.I., Vivo A., Koopmans M.P.G. 2000. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging Infectious Diseases*, 6: 36-41
- Vennema H., de 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., Altena S., Koopmans M. 1997. The incidence and genetic variability of small-round-structured viruses (SRSV) in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*, 176: 1374-1378
- Vinje J., Deijl R., van der Heide D., Lewis K.O.H., Svensson L., Koopmans M.P.G. 2000. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 530-536
- Wang Q.-H., Han M.G., Funk J.A., Bowman G., Janiels D.A., Saif L.J. 2005. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5963-5972

Wawrzekiewicz J., Smale CJ, Brown F. 1968. Biochemical and biophysical characteristics of vesicular exanthema virus and the viral ribonucleic acid. *Archiv fuer gesamte Virusforschung*, 25: 337-351

Williams F. P. 2008. Nasba assay for noroviruses. St. Petersburg, University of South Florida, marine microbiology group.

<http://www.marine.usf.edu/microbiology/nasba-noroviruses.shtml> (junij 2008): 1 str.