

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Duša DOLENC

**MOLEKULARNO DOLOČANJE KALICIVIRUSOV V IZTREBKIH
PRAŠIČEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MOLECULAR DETECTION OF CALICIVIRUSES IN FAECES OF
PIGS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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 prof. dr. Tatjano Avšič-Županc.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin

Somentorica: dr. Mateja Poljšak-Prijatelj

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Duša Dolenc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 578.2:577.2.08(043)=863
KG *Caliciviridae*/kalicivirusi/norovirusi/prašičji iztrebki/prašičji kalicivirusi/določanje kalicivirusov/molekularne metode/RT-PCR
AV DOLENC, Duša
SA MARIN, Jožica (mentorica)/ POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (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 KALICIVIRUSOV V IZTREBKIH PRAŠIČEV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII, 48 str., 7 pregl., 9 sl., 101 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kalicivirusi povzročajo bolezni tako pri živalih kot človeku. Znotraj družine kalicivirusov ločimo štiri rodove: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* in *Norovirus*. Norovirusi so najpogostejši povzročitelji nebakterijskega gastroenteritisa pri odraslih, medtem ko so sapovirusi v glavnem povezani z občasnimi izbruhi gastroenteritisa pri otrocih. Pogost vzrok epidemij so zaradi nizkega infektivnega odmerka, odpornosti na okoljske dejavnike in oralno-fekalne poti prenosa, ki omogoča naglo širitev okužbe. Črevesne viruse, podobne norovirusnim in sapovirusnim sevom človeških kalicivirusov, so našli tudi pri govedu in prašičih. V primeru, da so farmske živali možen rezervoar človeških kalicivirusov, se lahko okužijo delavci, ki so z živalmi v pogostem stiku. Namen raziskovalne naloge je bil oceniti to možnost v Sloveniji, zato smo zbrali iztrebke zdravih prašičev z nekaterih slovenskih farm in v njih molekularno določali kaliciviruse. Nekatere vzorce smo po odvzemu združili in šele nato iz njih izolirali RNK. Za pomnoževanje RNK smo uporabili metodo RT-PCR s parom začetnih oligonukleotidov JV12Y/JV13I, ki pomnožuje odsek norovirusnega genoma na polimerazni regiji. Pridelke pomnoževanja smo določili z gelsko elektroforezo. Zaradi majhnega števila pozitivnih vzorcev smo postopek RT-PCR naredili še z drugim parom začetnih oligonukleotidov p290/NVp110, ki pomnožuje del polimerazne regije genoma tako pri norovirusih kot sapovirusih. Tako smo dobili več pozitivnih rezultatov. Noroviruse pri zdravih prašičih s farm smo potrdili, vendar pa po sekveniranju dobljena nukleotidna zaporedja niso pripadala genski skupini človeških norovirusov. Tako zaenkrat nismo uspeli potrditi možnosti zoonotskega prenosa teh virusov s prašičev na človeka.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.2:577.2.08(043)=863
CX *Caliciviridae*/caliciviruses/noroviruses/pig faeces/pig caliciviruses/detection of caliciviruses/molecular methods/RT-PCR
AU DOLENC, Duša
AA MARIN, Jožica (supervisor)/ POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (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 CALICIVIRUSES IN FAECES OF PIGS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 48 p., 7 tab., 9 fig., 101 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Caliciviruses are important pathogens in animals as well as in humans. Within the family *Caliciviridae*, four genera have been distinguished: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* and *Norovirus*. Human caliciviruses, especially noroviruses are a common cause of gastroenteritis outbreaks in adults worldwide. Sapovirus is mainly associated with sporadic gastroenteritis in infants and children. Low infection dose, high stability of the virus in the environment and person-to-person transmission enables quick spread of infection. Enteric viruses similar to norovirus and sapovirus strains of human caliciviruses had been found in calves and pigs. Some caliciviruses may have zoonotic potential and domestic animals such as pigs and cows may act as a reservoir for caliciviruses. When the farm animals serve as a possible reservoir of human caliciviruses it is possible for the workers who are in constant contact with the animals to get infected. The aim of our study was to assess this possibility in Slovenia. We collected pig stool samples from several Slovenian farms and tried to detect caliciviruses using molecular methods. Before the isolation of viral RNA samples were usually pooled. Conserved polymerase segment of norovirus genome was amplified by application of the RT-PCR using primer pair JV12Y and JV13I. Amplified products were determined by gel electrophoresis. Because of small number of positive samples additional pair of primers p290 and NVp110 targeting the conserved motif of the polymerase region of noroviruses as well as sapoviruses was used. This way we obtained a higher number of positive results. The presence of noroviruses in several healthy pigs in Slovenia was confirmed. Further analysis after sequencing showed that these viruses did not cluster together with any known strain of human noroviruses. The possibility of zoonotic transmission of these noroviruses from pigs to human was not confirmed.

KAZALO VSEBINE

	stran
Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	VII
Okrajšave in simboli.....	VIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV	4
2.2 RAZDELITEV ČLOVEŠKIH KALICIVIRUSOV	5
2.3 RAZDELITEV ŽIVALSKIH KALICIVIRUSOV	6
2.4 GENOM IN PROTEINI	7
2.5 RAZMNOŽEVANJE	9
2.6 PATOGENEZA IN KLINIČNI ZNAKI	9
2.7 EPIDEMIOLOGIJA	12
2.7.1 Sezonsko pojavljanje kalicivirusnih okužb	13
2.7.2 Molekularna epidemiologija.....	13
2.8 DIAGNOSTIKA.....	14
2.8.1 Elektronska mikroskopija	14
2.8.2 Dokazovanje virusnih antigenov	16
2.8.3 Dokazovanje nukleinske kisline	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Zbiranje in shranjevanje materialov	17
3.1.2 Materiali in reagenti za osamitev RNA s trizolom	17
3.1.3 Reagenti za reakcijo RT-PCR	17
3.1.4 Materiali za analizo pridelka PCR z agarozno gelsko elektroforezo.....	18
3.1.5 Laboratorijska oprema in aparati	19

3.2 METODE DELA	19
3.2.1 Priprava vzorcev	19
3.2.2 Osamitev RNK s trizolom	20
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo	20
3.2.3.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo	20
3.2.3.2 Enostopenjska reakcija verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR)	21
3.2.3.2.1 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I	22
3.2.3.2.2 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi p290 in NVp110	23
3.2.3.2.3 Optimizacija metode RT-PCR. Izbira pozitivne kontrole in določanje temperature prileganja začetnih oligonukleotidov p290 in NVp110.....	24
3.2.4 Analiza pridelkov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu	24
4 REZULTATI.....	26
4.1 ZNAČILNOSTI VZORCEV	26
4.2 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA NOROVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR (Access RT-PCR System, Promega).....	26
4.2.1 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi JV12Y/JV13I	28
4.2.2 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi p290/NVp110	28
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	30
5.1 RAZPRAVA.....	30
5.1.1 Pomnoževanje tarčnih odsekov genoma norovirusov z enostopenjsko reakcijo RT-PCR	32
5.1.2 Značilnosti vzorcev	33
5.2 SKLEPI.....	34
6 POVZETEK.....	35
7 VIRI	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Kriptogrami za nekatere kalicivirusse (Green in sod., 2000: 181).....	4
Preglednica 2-2: Razdelitev človeških norovirusov (Koopmans in sod., 2002b: 519).....	5
Preglednica 2-3: Razdelitev človeških sapovirusov (Farkas in sod., 2004: 1320).....	6
Preglednica 2-4: Razdelitev živalskih kalicivirusov (USDA, 2003: 4).....	7
Preglednica 3-1: Nekateri značilnosti začetnih oligonukleotidov JV12Y in JV13I (Vennema in sod., 2002).....	23
Preglednica 3-2: Nekateri značilnosti začetnih oligonukleotidov p290 in NVp110 (Le Guyader in sod., 1996; Jiang in sod., 1999).....	23
Preglednica 4-1: Starost prašičev z nekaterih slovenskih farm.....	26

KAZALO SLIK

Slika 2-1: Genom virusa Norwalk (Green in sod., 2000: 181).....	8
Slika 2-2: Virus Norwalk - krioelektronska mikroskopska slika (Prasad in sod., 1999: 288).....	9
Slika 2-3: Elektronsko mikroskopski posnetek kalicivirusov v iztrebku bolnika, posnet v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani	15
Slika 3-1: Agarozni gel z nekaj vzorci pomnoženega tarčnega odseka genoma norovirusov s parom začetnih oligonukleotidov p290/NVp110	25
Slika 4-1: Rezultati pomnoževanja odseka genoma norovirusov z obema paroma začetnih oligonukleotidov pri sesnih prašičih.....	27
Slika 4-2: Rezultati pomnoževanja odseka genoma norovirusov z obema paroma začetnih oligonukleotidov pri odstavljenih prašičih.....	27
Slika 4-3: Rezultati pomnoževanja odseka genoma norovirusov z obema paroma začetnih oligonukleotidov pri pitanih prašičih.....	28
Slika 4-4: Primerjava rezultatov, dobljenih z reakcijo RT-PCR, pri uporabi enega in drugega para začetnih oligonukleotidov.....	29
Slika 4-5: Število pozitivnih vzorcev pri reakciji RT-PCR po mesecih.....	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMV	- virus ptičje mieloblastoze (ang.: Avian Myeloblastosis Virus)
BoCV	- goveji kalicivirus (ang.: Bovine Calicivirus)
bp	- bazni par
cDNK	- komplementarna DNK (ang.: complementary DNA)
Da	- dalton
ddH ₂ O	- demineralizirana destilirana voda
DNK	- deoksiribonukleinska kislina
dNTP	- deoksinukleotid trifosfat
EBHS	- virus sindroma evropskega rjavega kunca (ang.: European Brown Hare Syndrome Virus)
EM	- elektronska mikroskopija
ELISA	- encimsko imunski test (ang.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FCV	- mačji kalicivirus (ang.: Feline Calicivirus)
GGI	- genska skupina I
GGII	- genska skupina II
GGIII	- genska skupina III
ORF	- odprt bralni okvir (ang.: open reading frame)
PCR	- verižna reakcija s polimerazo (ang.: Polymerase Chain Reaction)
PEC	- prašičji črevesni kalicivirus (ang.: Porcine Enteric Calicivirus)
RHDV	- virus zajčje hemoragične bolezni (ang.: Rabbit Hemorrhagic Disease Virus)
RNK	- ribonukleinska kislina
RT	- reverzna transkripcija
SMSV	- virus morskega leva San Miguel (ang.: San Miguel Sea lion Virus)
<i>Tfl</i>	- <i>Thermus flavus</i>
U	- enota za encimsko aktivnost (ang.: unit)
VESV	- virus vezikularnega eksantema pri prašičih (ang.: Vesicular Exanthema of Swine Virus)

1 UVOD

Kalicivirusi so ikozaedrični virusi brez ovojnice, ki so jih poimenovali po čašastih vdolbinah na obodu. Genom je linearna, enojnovijačna, pozitivno polarna RNA. Človeške kaliciviruse predstavljata rodova *Norovirus* in *Sapovirus*, ki se delita na genske skupine, le-te pa na genotipe (Atmar in Estes, 2001; Green in sod., 2002; Farkas in sod., 2004). Kalicivirusi so pogost vzrok bolezni pri ljudeh in živalih. Pri ljudeh so znani kot povzročitelji akutnega gastroenteritisa in so razširjeni 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., 2002b; Lopman in sod., 2002).

Prvo bolezen, kjer so kot povzročitelja prepoznali kaliciviruse, so opisali leta 1932 pri bolnih prašičih na farmi v Kaliforniji (Traum, 1936). Do danes pa so kaliciviruse izolirali že iz mnogih živalskih vrst. Bolezen lahko povzročijo tako pri divjih kot pri udomačenih živalih. Posledice so različne glede na vrsto živali, od nezmožnosti razmnoževanja pri prašičih, krvavitev pri zajcih, do bolezni dihal pri mačkah (USDA, 2003). Pri prašičih in govedu pa so našli črevesne viruse, podobne norovirusnim in sapovirusnim sevom človeških kalicivirusov (van der Poel, 2000). Predvsem sevi kalicivirusov, ki povzročajo okužbe črevesja, predstavljajo potencialno nevarnost ljudem zaradi fekalno-oralne poti prenosa okužbe. Živali na farmah so možni rezervoarji človeških kalicivirusov in grožnja ljudem, ki so v pogostem stiku z živalskimi iztrebki.

Človeški kalicivirusi se ne razmnožujejo v celičnih kulturah ali v živalskih modelih. Določajo jih z direktno elektronsko mikroskopijo, kot tudi z encimsko imunskimi in predvsem molekularnimi metodami, to je verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo – RT-PCR (Atmar in Estes, 2001).

1.1 NAMEN

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti navzočnost in razširjenost norovirusov med zdravimi prašiči na nekaterih farmah v Sloveniji in oceniti možnost, da so živali rezervoar sevov človeških kalicivirusov. Pričakovali smo, da bomo v vzorcih izrebkov živali dokazali RNK kalicivirusov, ki pripadajo genski skupini človeških kalicivirusov.

2 PREGLED OBJAV

Prvo bolezen, ki jo povzročajo kalicivirusi, so zabeležili leta 1932 v ZDA, ko so odkrili virus vezikularnega eksantema prašičev (Traum, 1936). Prvi norovirus je dobil svoje ime po izbruhu gastroenteritisa leta 1968 v osnovni šoli mesteca Norwalk v Ohio. Norwalk virus so odkrili 4 leta pozneje in ga sprva opisali kot pikornavirus ali parvovirus na podlagi izgleda pod elektronskim mikroskopom (Kapikian in sod., 1972). S kasnejšimi študijami so ugotovili, da virusne gastroenteritise povzročajo tudi drugi mali okrogli strukturirani virusi, morfološko podobni virusom Norwalk (Atmar in Estes, 2001; Koopmans in sod., 2002a).

Leta 1976 so prvič opisali morfološko značilne kaliciviruse v iztrebkih otrok (Madeley in Cosgrove, 1976). Pri opazovanju teh virusov z elektronskim mikroskopom so bile vidne čašaste vdolbine na obodu, odtod tudi ime kalicivirusi (lat. Calyx: čaša) (Madeley, 1979). Mnogo kasneje so Jiang in sod. klonirali in opisali značilnosti genoma virusov Norwalk ter jih uvrstili med kaliciviruse, ker vsebujejo pozitivno polarno, enojnovijačno, poliadenilirano RNK (Jiang in sod., 1990).

Človeški kalicivirusi se ne razmnožujejo v celičnih kulturah, zato so jih dolgo določali le z direktno elektronsko mikroskopijo. Po uspešnem kloniranju virusov Norwalk so razvili nove reagentne in metode za dokazovanje okužb s človeškimi kalicivirusi. Za dokazovanje virusnih antigenov ali protiteles proti antigenom so razvili encimsko imunske teste. S spoznavanjem nukleotidnega zaporedja virusnega genoma so razvili tudi začetne oligonukleotide, ki so jih uporabili za dokazovanje človeških kalicivirusov z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo - RT-PCR (Jiang, 1990, 1992a, 1992b; Atmar in Estes, 2001). Izboljšave v diagnostiki so vodile do objave celotne sekvence genoma virusov Norwalk in Southampton (Jiang in sod., 1993; Lambden in sod., 1993). Informacije o genomu in opis značilnosti sapovirusov (Matson in sod., 1995; Numata in sod., 1997) so potrdile, da so norovirusi in sapovirusi sorodni virusi (Greenberg in sod., 1981; Cubitt in sod., 1994; Liu in sod., 1995; Matson in sod., 1995).

2.1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Ko so leta 1979 uradno potrdili obstoj družine *Caliciviridae* (Matthews, 1979), so med skupne lastnosti navedli en glavni strukturni protein, iz katerega je zgrajena kapsida ter 32 vdolbinic v obliki čašic na površini viriona ikozaedrične oblike. Prav tako pomembna lastnost je nemetiliran 5' konec virionske RNK, kjer je kovalentno vezan protein (VPg), ki naj bi bil bistvenega pomena pri infektivnosti RNK (Burroughs in Brown, 1978). Kaliciviruse so zaradi velikosti pred tem uvrščali med pikornaviruse, pri obeh družinah pa je podobna tudi ureditev nestrukturnih proteinov: helikaze, VPg, proteaze ter polimeraze. Glavna razlika med kalicivirusi in pikornavirusi je v ureditvi strukturnih proteinov, ki so pri pikornavirusih zakodirani na 5' koncu, pri kalicivirusih pa na 3' koncu genoma. Poleg tega pikornavirusi ne sintetizirajo podgenomske RNK (Thiel in König, 1999).

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

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

Njihova velikost je od 27 do 40 nm. (Atmar in Estes, 2001).

Za lažjo komunikacijo med raziskovalci se kalicivirusi označujejo s kriptogramom, ki vsebuje: izvorno gostiteljsko vrsto / rod / gensko skupino / imenovanje seva / leto odkritja / izvorno državo (Preglednica 2-1) (Green in sod., 2000).

Preglednica 2-1: Kriptogrami za nekatere kaliciviruse (Green in sod., 2000: 181).

Ime virusa	Kriptogram
Norwalk virus	Hu/NV/I/Norwalk/1968/US
Feline CV, sev F9	Fe/VV/FCV/F9/1960/US
Jena virus	Bo/Jena/80/DE

2.2 RAZDELITEV ČLOVEŠKIH KALICIVIRUSOV

Rod *Norovirus* se deli v vsaj dve genski skupini glede na genetske različnosti v polimerazni in kapsidni regiji (Ando in sod., 2000). Obstajajo pa različne razdelitve genskih skupin norovirusov na genotipe (Preglednica 2-2). Virusi, ki spadajo v isti genotip, imajo več kot 80 % podobnost v aminokislinah kapsidnega proteina in več kot 85 % podobnost za GGI ali 90 % za GGII v nukleotidih na polimeraznem delu genoma (Vinje in sod., 2000b; Koopmans in sod., 2002b).

Preglednica 2-2: Razdelitev 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	

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 2-3) okužijo ljudi, sev iz genske skupine III pa okuži prašiče (Farkas in sod., 2004).

Preglednica 2-3: Razdelitev človeških sapovirusov (Farkas in sod., 2004: 1320).

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

2.3 RAZDELITEV ŽIVALSKIH KALICIVIRUSOV

Večina živalskih kalicivirusov spada v rodova *Vesivirus* in *Lagovirus*, nekaj vrst pa najdemo tudi v rodovih *Norovirus* in *Sapovirus* (Green in sod., 2002). Nekaj primerov živalskih kalicivirusov pri različnih živalskih vrstah, ki jih je leta 1999 odobril ICTV (ang. International Committee on Taxonomy of Viruses) prikazuje preglednica 2-4. Nekateri od teh virusov niso specifični za določenega gostitelja in okužijo več vrst živali. Mačji kalicivirusi (ang. Feline Calicivirus /FCV) lahko poleg mačk okužijo še pse in kojote, serološko pa so dokazali tudi okužbo pri ljudeh (USDA, 2003).

S sekveniranjem so ugotovili, da so goveji norovirusi Jena in Newbury agent-2 sorodni človeškemu norovirusom iz GGI (Liu in sod., 1999; Dastjerdi in sod., 1999), vendar pa tvorijo samostojno gensko skupino znotraj rodu *Norovirus* (Han in sod., 2004). Prašičji norovirusi pa so po sekvenci blizu človeškemu norovirusom iz GGII (Sugieda in sod., 1998; Sugieda in Nakajima, 2002). Prašičji sapovirusi pripadajo GG III, našli pa so tudi sev, ki je blizu človeškemu sapovirusom iz GGII (Wang in sod., 2005).

Preglednica 2-4: Razdelitev živalskih kalicivirusov (USDA, 2003: 4).

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

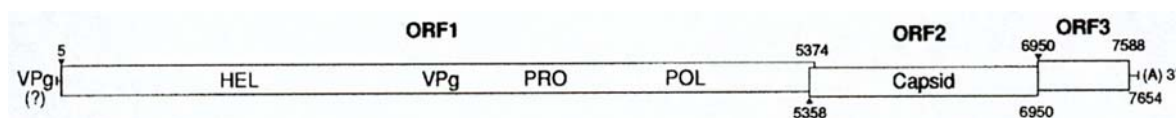
* (Han in sod., 2004)

** (Wang in sod., 2005)

2.4 GENOM IN PROTEINI

Genom človeških kalicivirusov je pozitivno polarna, enojnovijačna molekula RNA, ki ima na 3' koncu poliadenilno skupino (Clarke in Lambden, 1997). Dolžina genoma je od 7400 do 7800 nukleotidov. Sestavljen je iz treh odprtih bralnih okvirjev : ORF1, ORF2 in ORF3 (ang. ORF: Open reading frame). Genoma norovirusov in sapovirusov se razlikujeta glede na razporeditev odprtih bralnih okvirjev (Green in sod., 2000).

Slika 2-1: Genom virusa Norwalk (Green in sod., 2000: 181).



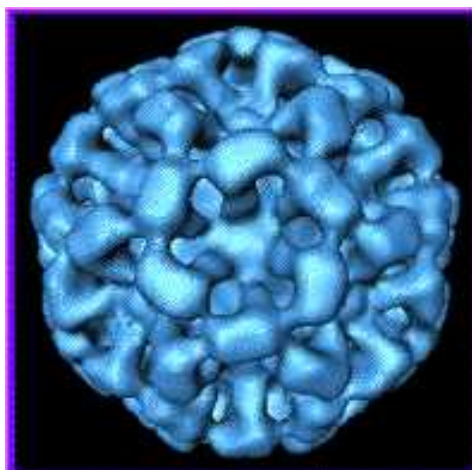
Na 5' koncu genoma virusov Norwalk je 4 nukleotide dolga nekodirajoča regija (Slika 2-1). Sledi ji ORF1, ki kodira poliprotein, dolg 1789 aminokislin. Predvidena molekulska masa je 193,5 kDa. Poliprotein vsebuje ohranjene regije aminokislin, ki kažejo podobnost

z 2C (helikaza), 3C (proteaza) in 3D (od RNK odvisna polimeraza RNK) proteini pikornavirusov (Jiang in sod., 1993; Glass in sod., 2000). Po prevajanju se poliprotein s proteolizo pretvori v nestrukturane proteine, ki so potrebni za razmnoževanje virusa. Razreže ga eden od produktov poliproteina – proteaza (Clarke in Lambden, 1997).

Med ORF1 in ORF2 virusov Norwalk je 17 nukleotidov dolga regija prekrivanja bralnih okvirjev (Clarke in sod., 1998). Regija ORF2 kodira 530 aminokislin dolg strukturni kapsidni protein, velik približno 56 kDa (Jiang in sod., 1993).

Izražanje genov za kapsidni protein v celicah insektov, okuženih z bakulovirusnimi rekombinantami, vodi do produkcije kapsidnih proteinov, ki se samo-sestavijo v delce, podobne virusom (ang. VLP: virus like particles) (Jiang in sod., 1992b). Ti delci so morfološko podobni naravnim virusom, zato so jih uporabljali za preučevanje strukture virusov Norwalk s krioelektronsko mikroskopijo in računalniško obdelavo slik, kot tudi s kristalografskimi metodami. S temi raziskavami so odkrili, da tridimenzionalno ikozaedrično strukturo virusnih delcev sestavlja 180 kopij kapsidnega proteina. (Prasad in sod., 1994; Prasad in sod., 1999). Kapsidni protein se sklopi v 90 dimerov, ki tvorijo ogrodje kapside, iz katere štrlijo kapsomere v obliki loka (slika 2-2). Ključna značilnost te zgradbe je 32 čašastih vdolbinic na obodu, ki so bolj vidne pri nekaterih vrstah iz rodu sapovirusov (Atmar in Estes, 2001).

Na zadnjem delu genoma je ORF3, ki s prvim nukleotidom začetnega kodona prekriva zadnji nukleotid končnega kodona ORF2 (Clarke in Lambden, 2000). ORF3 kodira majhen strukturni protein, dolg 212 aminokislin. Predvidena molekulska masa je 22,5 kDa. Njegova funkcija ostaja še neznan. V raziskavi, kjer so preučevali ORF3 virusov Norwalk, so ta strukturni protein našli v delcih, podobnih virusom, ki so nastali s prepisom cDNK, ki je vsebovala ORF2 in ORF3, ter v virusnih delcih, izoliranih iz iztrebkov bolnikov. Rezultati kažejo, da je ORF3 strukturni protein viriona (Glass in sod., 2000).



Slika 2-2: Virus Norwalk - krioelektronska mikroskopska slika (Prasad in sod., 1999: 288).

Genom virusov Norwalk se zaključuje s 66 nukleotidov dolgo 3' nekodirajočo regijo in poli-A repom (Jiang in sod., 1993). Ti virusi imajo tudi več kot 2 kb dolgo podgenomsko RNK z ORF2 in ORF3 (Jiang in sod., 1993). ORF1 sapovirusov (virus Manchester) je daljši od ORF1 norovirusov, ker ima poleg zapisa za nestrukturirane proteine tudi zapis za kapsidni protein. ORF2 kodira osnovni protein z neznanom funkcijo, podoben ORF3 pri norovirusih. ORF3 virusa Manchester je znotraj kapsidnega proteina in kodira še en osnovni protein (Liu in sod., 1995).

2.5 RAZMNOŽEVANJE

O razmnoževanju človeških kalicivirusov je malo znanega (Desselberger in Gray, 2003). Ker se ne razmnožujejo v celičnih kulturah ali v živalskih modelih, je preučevanje njihove biologije težavno. Velik napredek v poznavanju strategije kodiranja genov, organizacije genoma, pomnoževanja virusne RNK in izražanja genov, je omogočilo uspešno kloniranje in sekveniranje genoma virusov Norwalk in drugih človeških kalicivirusov (Jiang in sod., 1992b; Jiang in sod., 1993; Hardy in Estes, 1996).

2.6 PATOGENEZA IN KLINIČNI ZNAKI

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, 1996). 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. Pri posameznikih s kliničnimi znaki so s svetlobno in elektronsko mikroskopijo prikazali lezije na sluznici tankega črevesja. Notranja plast sluznice je bila vneta in epiteljske 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., 1973; Schreiber in sod., 1974; Dolin in sod., 1975; Lopman in sod., 2002).

Človeški kalicivirusi povzročajo pri ljudeh akutni gastroenteritis. Inkubacijska doba je od 1 do 3 dni. Glavni znaki okužbe so slabost, bruhanje in driska, lahko pa se pojavijo tudi trebušni krči, mrzlica, bolečine v mišicah, glavobol in bolečine v grlu. Pri otrocih se pogosteje pojavlja bruhanje kot driska, obratno pa so opazili pri odraslih. Klinični znaki trajajo 2 do 3 dni, pri starejših ljudeh lahko tudi dlje. Okužba je običajno blaga in bolezen sama zamre. (Kaplan in sod., 1982; Kapikian in sod., 1996). Poročali so tudi že o smrti zaradi okužbe z norovirusi, vendar vzročna zveza ostaja še nepotrjena (Koopmans in sod., 2002a).

Virusi iz rodu *Vesivirus* so klasični kalicivirusi, ki se jih da gojiti in niso črevesni patogeni, čeprav jih je možno osamiti tudi iz iztrebkov okuženih živali. Virus vezikularnega eksantema (VESV) in virusi morskega leva San Miguel (SMSV) povzročajo poškodbe na koži ter nezmožnost razmnoževanja pri prašičih ter morskih levih. Mačji in goveji kalicivirusi pa 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 ima do 100% smrtnost. Bolezen je podobna pri evropskem rjavem kuncu (Guo in Saif, 2003).

Živalski črevesni kalicivirusi so patogeni; pojavljajo se pri prašičih, teletih, piščancih, psih in mačkah (Saif in sod., 1980; Bridger in sod., 1984, 1990; Guo in sod., 2001). Prašičji črevesni kalicivirusi (PEC) in goveji črevesni kalicivirusi (BEC, Newbury agent-2 in Jena virus) so genetsko sorodni človeškemu sapovirusom in norovirusom (Dastjerdi in sod., 1999; Guo in sod., 1999; Liu in sod., 1999). Tako prašičji kot goveji kalicivirusi okužijo

mikrovile črevesnih celic tankega črevesa ter povzročijo drisko pri gostitelju (Saif in sod., 1980).

Prepoznavanje okužbe z norovirusi lahko zanesljivo temelji na kliničnih znakih in epidemioloških značilnostih (Kaplan in sod., 1982). Virusi se izločajo z iztrebki in izbruhki. Norovirusi so pogosto tudi v trdnih iztrebkih, čeprav je driska eden glavnih znakov gastroenteritisa in se z njenim koncem lahko pričakuje iztek bolezni. Ugotovili so tudi, da se izločanje virusov začne že dan pred nastopom glavnih znakov bolezni in lahko traja tudi 10 dni ali več (Kaplan in sod., 1982; Kapikian in sod., 1996). Norovirusi se izločajo v velikem številu v začetnem obdobju bolezni, z najvišjimi titri 10^8 virusnih delcev na gram iztrebka. Prenašajo se že med inkubacijsko dobo in celo po prenehanju kliničnih znakov. V 30 % primerov oboleli izločajo viruse do tri tedne po okužbi (Koopmans in Duizer, 2004).

O imunosti na norovirusne infekcije je malo znanega. 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). Parrino in sod. (1977) so v raziskavah s prostovoljci ugotovili, da se dolgotrajna imunost na človeške kaliciviruse ne pojavi. Tako kot pri drugih raziskavah s prostovoljci pa nekateri od izpostavljenih niso razvili znakov okužbe ne pri prvi in ne pri drugi izpostavitvi virusu. Vzrok, da nekateri posamezniki razvijejo gastroenteritis po okužbi z norovirusi, drugi pa ne, je mogoče razlika 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). Pri živalih je mačji kalicivirus edini, za katerega je komercialno dostopno cepivo. Razlog, da ni cepiv za kaliciviruse drugih domačih živali, je lahko redkost okužbe ali redkost diagnoze le-te. Odsotnost cepiv je možna tudi zaradi pomanjkanja interesa veterinarske farmacevtske industrije (USDA, 2003).

2.7 EPIDEMIOLOGIJA

V zahodnem svetu poročajo, da so norovirusi vzrok za 68-80% izbruhov gastroenteritisa, ocene gredo tudi do 90%. Do 15% okužb pride s hrano in vodo (Duizer in sod., 2004). Delež norovirusnih gastroenteritsov zaradi okužbe s hrano je zelo različen od ene države do druge. Vzrok so razlike v nadzornih sistemih in metodah, uporabljenih za diagnostiko (Vinje in Koopmans, 1996; Vinje in sod., 1997; Koopmans in sod., 2000). Delež epidemij, povzročenih z norovirusi, se spreminja iz leta v leto. Lopman in sod. (2004) so na podlagi zbranih podatkov o gastroenteritisnih epidemijah v desetih evropskih državah, vključno s Slovenijo, ugotovili, da je število okužb, povzročenih z norovirusi, leta 2002 precej narastlo v primerjavi s prejšnjimi leti. V štirih državah so največ epidemij zaznali v pomladanskih in poletnih mesecih tega leta, kar je neznačilno za okužbe z norovirusi. Do povečanega števila epidemij in spremenjenega vzorca sezonskega pojavljanja gastroenteritisa, povzročena 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).

Določanje kalicivirusov v iztrebkih je do leta 2000 v Sloveniji temeljilo le na določanju virusov z elektronsko mikroskopijo. Zaradi nizke občutljivosti te metode, kalicivirusov pogosto niso določili. Z uvajanjem molekularnih metod (RT-PCR) se je število pozitivnih rezultatov zvišalo, hkrati pa se je povečalo razumevanje epidemiologije norovirusov (Poljšak-Prijatelj in sod., 2001a; Poljšak-Prijatelj in sod., 2001b).

Človeški kalicivirusi se širijo med ljudmi z neposrednim stikom ali posredno s kontaminirano hrano, vodo ali vnosom iz okolja. Pot okužbe je fekalno-oralna ali z aerosoli, ki se sproščajo pri bruhanju (Pether in Caul, 1983; Koopmans in Duizer, 2004). Infektivni odmerek je verjetno 10-100 virusnih delcev (Caul, 1994). Opisanih je bilo že veliko norovirusnih epidemij zaradi kontaminirane hrane, katerih vzrok so najpogosteje okuženi posamezniki, školjke, sadje in zelenjava, ki se kontaminira med spiranjem z vodo. Pogosti so tudi prenos virusov s pitjem okužene vode ter pri uporabi rekreativnih voda kot so jezera in bazeni (Lopman, 2002; Koopmans in Duizer, 2004). Zanimivo je odkritje kalicivirusne RNK v ustekleničeni mineralni vodi (Beuret, 2000), čeprav morajo te

ugotovitve potrditi še z drugimi metodami (Koopmans in sod., 2002a). Zaenkrat še ni prišlo do prenosa kalicivirusov iz živali na človeka, vendar zaradi podobnosti v nukleotidnih in aminokislinskih zaporedjih genoma predlagajo, da so živalski rezervoarji človeških kalicivirusov verjetni (Lopman, 2002).

2.7.1 Sezonsko pojavljanje kalicivirusnih okužb

Že leta 1929, ko je Zahorsky opisal epidemijo virusnega gastroenteritisa kot "zimsko bolezen z bruhanjem" je bilo jasno, da se kalicivirusne okužbe pojavljajo sezonsko. Mounts in sod. so s pregledom 12 raziskav ugotovili, da norovirusne okužbe prevladujejo v hladnejših mesecih, ne glede na starost bolnikov ali uporabljeno metodo dokazovanja (Mounts in sod., 2000). 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; Pang in sod., 2000; Schreier in sod., 2000). Na Nizozemskem, v Nemčiji, na Finskem, v Angliji 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).

2.7.2 Molekularna epidemiologija

Obdobje molekularne epidemiologije se je za človeške kaliciviruse začelo s kloniranjem genoma virusov Norwalk. Razvili so metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR), ki so jo na začetku optimizirali za določanje omejenega izbora sevov. Rezultat je bila visoka občutljivost metode in ozek razpon določitve sevov (Jiang in sod., 1992a; Moe in sod., 1994; Ando in sod., 1995a; Ando in sod., 1995b). Zaradi ugotovitve, da so kalicivirusi genetsko zelo različna skupina virusov, so poskušali razviti metode detekcije, s katerimi bi zaznali širok razpon sevov. Razvili so mnogo začetnih oligonukleotidov, ki nalegajo na genomu norovirusov in sapovirusov (Green in sod., 1993; Ando in sod., 1995a, Ando in sod., 1995b; Le Guyader in sod., 1996a; Vinje in

sod., 1996, Vinje in sod., 2000a; Wright in sod., 1998; Jiang in sod., 1999; Maunula in sod., 1999; Schreier in sod., 2000; Atmar in Estes, 2001). Večina začetnih oligonukleotidov nalega na ohranjenem delu RNK, znotraj polimeraznega gena, katerega PCR produkte uporabljajo za tipiziranje vrst (Koopmans in sod., 2002b). Za razlikovanje med genskimi skupinami pa uporabljajo začetne oligonukleotide, ki nalegajo na kapsidnem delu RNK in so specifični za gensko skupino I ali gensko skupino II (Kojima in sod., 2002). Večino okužb s človeškimi kalicivirusi pripisujejo genski skupini II norovirusov (Fankhauser in sod., 1998; Smit in sod., 1999; Koopmans in sod., 2002b). Pri epidemijah, povzročenih z norovirusi, se nekateri genotipi pojavljajo pogosteje kot drugi. Prevladujoč je genotip 4 genske skupine II norovirusov. V raziskavah na Nizozemskem so ugotovili, da se ta genotip pojavlja pogosto, vendar se delež epidemij, povzročenih s tem genotipom, spreminja iz leta v leto (Koopmans in sod., 2002b).

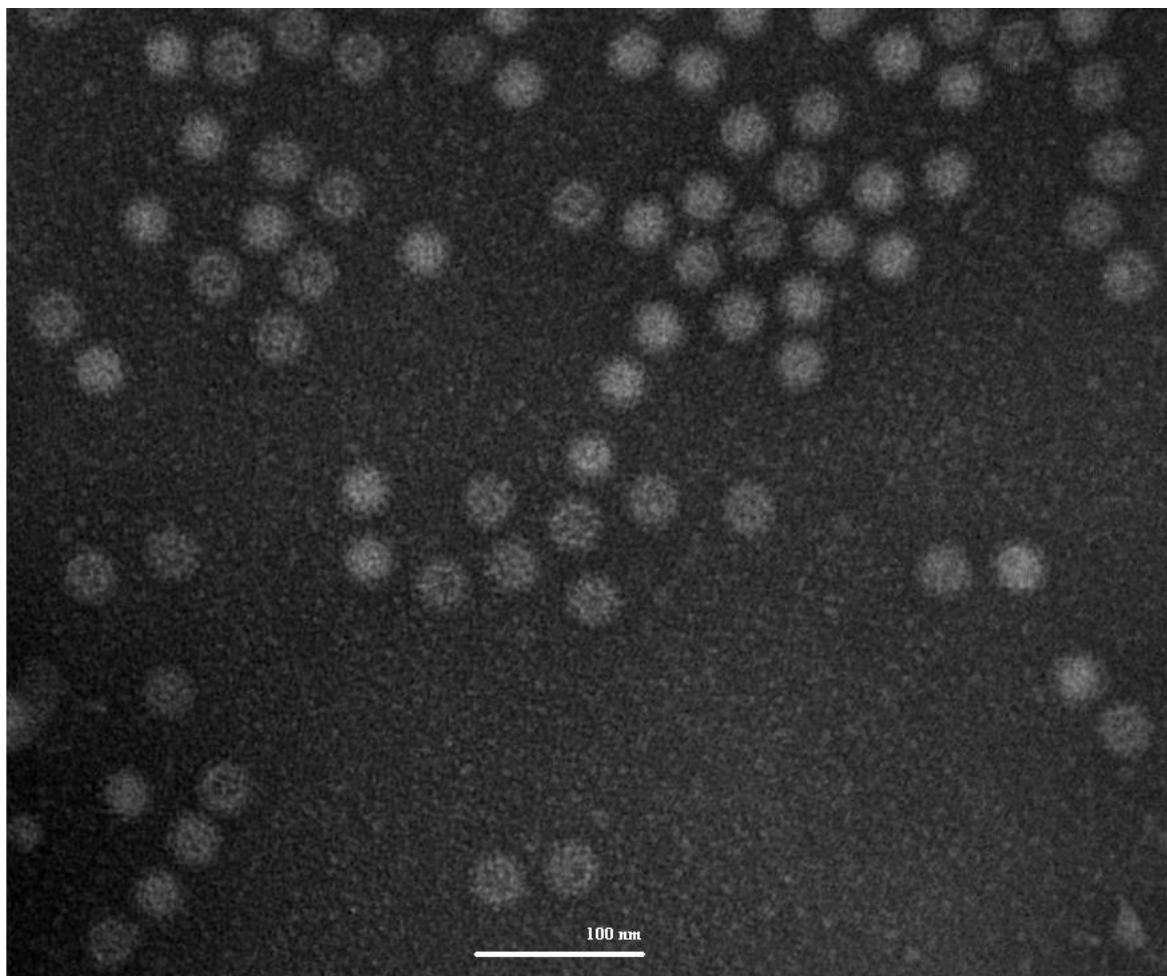
2.8 DIAGNOSTIKA

Človeški kalicivirusi se ne razmnožujejo v celičnih kulturah ali tkivih, zato je njihovo dokazovanje dolgo temeljilo le na elektronski mikroskopiji (EM). Po uspešnem kloniranju norovirusov so razvili nove reagentne in metode za diagnostiko okužb, tako encimsko imunske kot molekularne – verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) (Atmar in Estes, 2001).

2.8.1 Elektronska mikroskopija

Za dokazovanje kalicivirusnih okužb uporabljajo neposredno metodo negativnega kontrastiranja z različnimi kontrastnimi sredstvi. Ta metoda je relativno neobčutljiva, saj je za odkritje virusov v vzorcu potrebna koncentracija vsaj 10^6 virusnih delcev/ml iztrebka (Atmar in Estes, 2001). Tako lahko kaliciviruse dokažejo le do približno 48 ur po prenehanju znakov bolezni (Lopman in sod., 2002).

Norovirusi nimajo značilne kalicivirusne strukture, zato jih je težko ločiti od podobnih virusov z nejasno morfologijo (Atmar in Estes, 2001). Pri opazovanju značilnih kalicivirusov – sapovirusov z elektronskim mikroskopom pa so lepo vidne čašaste vdolbine na obodu (slika 2-3).



Slika 2-3: Elektronsko mikroskopski posnetek kalicivirusov v iztrebku bolnika, posnet v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani (Elektronsko mikroskopski posnetek EMD 040730).

2.8.2 Dokazovanje virusnih antigenov

Za dokazovanje kalicivirusnih antigenov uporabljajo encimsko imunski test (ELISA). Na tržišču sta le dva komercialno dostopna testa. Test IDEIA™ Norovirus izdelovalca Dako Cytomation (Danska) in RIDASCREEN Norovirus izdelovalca Biopharm (Nemčija). V primerjavi z RT-PCR je občutljivost testa 55,5 %, specifičnost pa 98,3 % (Richards in sod., 2003).

2.8.3 Dokazovanje nukleinske kisline

Za dokazovanje kalicivirusne RNK uporabljajo verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). V primerjavi z EM je RT-PCR precej bolj občutljiva diagnostična metoda, ki omogoča odkritje virusov dva tedna po okužbi in mogoče še dlje (Parashar in sod.,1998). Za nadaljnje povečanje občutljivosti so začeli uporabljati metodo nested RT-PCR. Z uporabo dveh parov začetnih oligonukleotidov, pri katerih drugi par nalega znotraj dela, pomnoženega v prvem krogu, se občutljivost lahko poveča za 10 do 1000 krat. Poveča se tudi specifičnost (Green in sod., 1998).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Zbiranje in shranjevanje materialov

V raziskavo smo vključili 128 iztrebkov zdravih prašičev iz slovenskih farm, ki so jih zbrali na Veterinarski fakulteti in Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v obdobju od 14.1.2004 do 14.1.2005. V fosfatnem pufru razredčeni iztrebki so bili do obdelave shranjeni pri -20 °C.

3.1.2 Materiali in reagenti za osamitev RNK s trizolom

- trizol (Invitrogen)
- kloroform (Merck)
- 2-propanol (Merck)
- 75 % etanol, pripravljen iz absolutnega etanola (Merck)
- demineralizirana in destilirana (ddH₂O) sterilna voda brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- 1,5 ml epruvete PLG (ang.: Phase Lock Gel) (Eppendorf)

3.1.3 Reagenti za reakcijo RT-PCR

Access komplet:

- ddH₂O - voda brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- 5x AMV/*Tfl* reakcijski pufer (Promega)
- MgSO₄, konc. 25 mM (Promega)
- mešanica dNTP, konc. 10 mM (Promega)
- začetni oligonukleotidi – polimerazna regija:
 - JV12Y in JV13I
 - P290 in NVp110

Vse začetne oligonukleotide smo dobili v liofilizirani obliki z znano maso.

- AMV reverzna transkriptaza, konc. 5U/ μ l (Promega)
- *Tfl* DNA polimeraza, konc. 5U/ μ l (Promega)

3.1.4 Materiali za analizo pridelka PCR z agarozno gelsko elektroforezo

- agaroz (Promega)
- 1x TAE puferska raztopina
Pripravimo jo z redčenjem 50x TAE puferske raztopine. Za pripravo 50x TAE puferske raztopine potrebujemo:
 - Tris baza 242,0 g
 - Ocetna kislina 57,0 g
 - EDTA 37,2 gTris bazo in EDTA dodamo v destilirano vodo do skupnega volumna 850 ml. Raztopimo reagente in dodamo očetno kislino, pH vrednost uravnamo na 8,5 ter dodamo vodo do 1000 ml.
- etidijev bromid
Pripravimo ga v koncentraciji 50 mg/ml:
 - etidijev bromid 500 mg
 - voda 10 mlIz te koncentracije pripravljamo delovno raztopino s koncentracijo 5 mg/ml z 10x redčenjem izhodne raztopine v 1x puferski raztopini TAE.
- 6x nanašalni pufer
Sestavljen je iz :
 - 40 % (ut/v) saharoza v 50 mM EDTA, pH=8
 - 0,25 % (ut/v) bromfenol modro
 - 0,25 % (ut/v) ksilen cianol1,86 g EDTA raztopimo v 100 ml vode, pH vrednost umerimo na 8 in raztopini dodamo 40 g saharoze. Ko je saharoza popolnoma raztopljena, dodamo še 0,25 g bromfenol modrila in 0,25 g ksilen cianola.

- označevalec molekularne mase DNK
- Uporabljali smo označevalec molekularne mase DNK 100 bp (Promega).

3.1.5 Laboratorijska oprema in aparati

- ultracentrifuga (Beckman)
- komori za varno delo (Iskra PIO in LFV 9)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415R)
- mešalo vorteks (Tehtnica Železniki)
- stojalo za epruvete (Eppendorf)
- plastične epruvete različnih velikosti (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml Eppendorf)
- avtomatske pipete Eppendorf z območji pipetiranja 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l.
- nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- termopomnoževalnik (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400)
- tehtnica (Sartorius)
- mikrovalovna pečica (MWG 729, Clatronic)
- napajalnik za elektroforezo (LKB Bromma)
- kadička za elektroforezo (Biometra)
- kamera za snemanje agaroznih gelov (BIO-RAD Gel doc 2000)
- računalniški program (Quantity one, BIO-RAD)
- merilni valj
- erlenmajerice
- staničevina
- zaščitne rokavice brez smukca (Safeskin)

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava vzorcev

Prašičjim iztrebkom v posodi za odvzem blata smo dodali 2 ml fosfatnega pufra, vorteksirali 1 minuto in odpipetirali 2 ml v epruveto. Vzorce v epruvetah smo centrifugirali

10 minut pri 1600x g in 4 °C ter supernatant odlili v centrifugirke in ultracentrifugirali pri 110000x g 1,30 h pri 4° C. Po končanem ultracentrifugiranju smo prenesli 1 ml supernatanta v mikrocentrifugirko in ga shranili pri -20 °C do nadaljne obdelave.

3.2.2 Osamitev RNK s trizolom

Postopek osamitve smo opravili v komori za sterilno delo. Uporabljali smo materiale in opremo brez ribonukleazne aktivnosti. Med delom smo pogosto menjavali rokavice. Centrifugirali smo pri temperaturi 4 °C.

V označene epruvete volumna 1,5 ml smo odpipetirali po 250 µl vzorca in dodali 750 µl trizola ter dobro suspendirali s pipetiranjem. Po 5 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo dodali 200 µl kloroforma in dobro premešali na mešalu. Mešanico smo prenesli v epruvete s PLG (ang. Phase Lock Gel), inkubirali pri sobni temperaturi 10 minut in centrifugirali 5 minut pri 14000x g. PLG tvori mejo med zgornjo vodno in spodnjo organsko fazo. Vodno fazo z RNK smo previdno prenesli v novo označeno epruveto, dodali 500 µl izopropanola, ohlajenega na -20 °C ter dobro premešali. Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo centrifugirali 10 minut pri 16000x g. Odlili smo supernatant in sprali RNK z 0,5 ml 75 % etanola, ohlajenega na -20 °C. Vsebinsko epruvet smo premešali na mešalu in centrifugirali 5 minut pri 9300x g. Ponovno smo odlili supernatant in posušili epruvete z RNK na dnu, nato pa smo RNK raztopili v 30 µl destilirane in demineralizirane sterilne vode brez ribonukleazne aktivnosti. Raztopljeno RNK smo do uporabe 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 (PCR, iz ang.: polymerase chain reaction) je najstarejša in največkrat uporabljena metoda pomnoževanja delcev nukleinskih kislin. V svoji klasični različici se izvaja na naslednji način: iz kliničnega materiala najprej z ustrežno metodo osamimo celotno DNK. Dodamo ji reakcijsko mešanico, ki vsebuje temperaturno obstojno polimerazo DNK, deoksinukleotidtrifosfate, par začetnih oligonukleotidov, soli in

detergent v določenih koncentracijah. Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en cikel PCR. Pri 95 °C se dvojnovijačna molekula vzorca razdvoji v dve enojnovijačni molekuli DNK. Pri drugi temperaturi, ki je navadno med 45 °C in 75 °C, se začetni oligonukleotidi pripenjajo na komplementarna dela vzorčne DNK. Podaljševanje začetnih oligonukleotidov oz. sinteza nove komplementarne molekule DNK v smeri od 5'-konca proti 3'-koncu poteka med tretjo inkubacijo pri 72 °C. Novi molekuli DNK sta med seboj komplementarni in sposobni v novem ciklusu s tremi inkubacijami vezati enake začetne oligonukleotide. Vsak naslednji temperaturni cikel podvoji količino tarčnega dela virusne DNK. Navadno PCR sestavlja od 25 do 40 zaporednih ponovitev temperaturnega cikla. Končni rezultat dogajanja je eksponentno kopičenje značilnih tarčnih delov DNK. Po zadnjem ciklu se celotna encimska reakcija največkrat ustavi z ohladitvijo reakcijske mešanice na +4 °C. Po končani reakciji PCR je rezultat pomnoževanja pozitiven ali negativen glede na to, ali smo dokazali pomnožen tarčni odsek virusnega genoma ali ne; pri pozitivnem rezultatu smo potrdili njegove značilnosti (Remick in sod., 1990; Poljak in sod., 1994; Poljak, 1998).

3.2.3.2 Enostopenjska reakcija verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR)

S klasičnim postopkom PCR lahko pomnožimo le DNK. Pri virusih z RNK pa moramo pred izvajanjem PCR osamljeno RNK z encimom reverzno transkriptazo prepisati v komplementarno DNK (cDNK, ang.: complementary DNK). Za prepis kalicivirusne RNK smo uporabili reverzno transkriptazo, osamljeno iz virusa ptičje mieloblastoze (AMV, ang.: Avian Mieloblastosis Virus). Nadaljni postopek je potekal enako kot pri klasičnem PCR. Reakcija je enostopenjska, ker reverzni prepis in pomnoževanje DNK potekata v eni epruveti in tako se zmanjša možnost kontaminacije. Za izvedbo RT-PCR smo uporabljali reagente komercialnega kompleta Access RT-PCR System proizvajalca Promega.

Najprej smo v pripravljene in označene 0,2 ml epruvete odpipetirali po 1 µl reverznega začetnega oligonukleotida (JV13I ali NVp110) s koncentracijo 50 pmol/µl in 5 µl vzorca RNK ali 5 µl 10x redčenega vzorca RNK v ddH₂O. Pri pozitivni kontroli smo začetnem oligonukleotidu dodali 5 µl vzorca RNK, ki smo ga predhodno 5x redčili v ddH₂O. Vzorec

za pozitivno kontrolo je bil predhodno potrjen s sekveniranjem. V epruvetko z negativno kontrolo smo namesto vzorca dodali 5 μl ddH₂O. Epruvete smo vstavili v termopomnoževalnik in nastavili program za denaturacijo (5 minut pri 90 °C). Po denaturaciji se je temperatura znižala na 4 °C.

V času denaturacije smo pripravili reakcijsko mešanico za določeno število vzorcev. Mešanica za en vzorec 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 ali p290) s koncentracijo 50 pmol/ μl
- 1 μl encima AMV reverzne transkriptaze (5 U/ μl)
- 1 μl encima *Tfl* DNK polimeraze (5 U/ μl)

Po 44 μl mešanice smo dodali denaturirani nukleinski kislini, tako da je bil končni volumen v vsaki epruveti 50 μl . Nastavili smo program za potek reakcije PCR, ki se je pri pomnoževanju različnih odsekov nukleinske kisline razlikoval le po temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov. Pri 42 °C je reverzni prepis RNK v komplementarno DNK potekal 45 minut. Zatem je 2 minuti segrevanja pri 94 °C omogočilo inaktivacijo reverzne transkriptaze in razdvajanje RNK-cDNK dvojnovijačnic. Sledilo je 40 temperaturnih ciklov:

- 30 sekund pri 94 °C: denaturacija cDNK
- 1 minuta pri 37 °C ali 40,7 °C: prileganje začetnih oligonukleotidov
- 2 minuti pri 68 °C: podaljševanje začetnih oligonukleotidov

Cikel se je zaključil s 7-minutnim končnim podaljševanjem pri 68 °C in ohlajanjem reakcijske mešanice na 4 °C. Po končani reakciji smo pridelke PCR shranili pri 4 °C.

3.2.3.2.1 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I

Za določanje norovirusov smo izbrali začetne oligonukleotide, ki so za človeške noroviruse skupinsko značilni in pomnožujejo 326 bp dolg ohranjen odsek gena za od RNK odvisno polimerazo RNK na ORF1 (Preglednica 3-1) (Vennema in sod., 2002).

Preglednica 3-1: Nekatere značilnosti 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

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37 °C. Za pozitivne kontrole smo izbrali RNK iz vzorcev človeških iztrebkov 584/04, 2084/04, 2069/04 (vzorci so bili predhodno potrjeni s sekveniranjem).

3.2.3.2.2 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi p290 in NVp110

Začetni oligonukleotidi p290 in NVp110 prav tako nalegajo na polimerazni regiji genoma norovirusov, vendar z nekaj baznih parov zamika v primerjavi z JV12Y/ JV13I (Preglednica 3-2). Pomnožujejo 316 bp dolg odsek gena za od RNK odvisno polimerazo RNK na ORF1 tako noro kot sapovirusov (Le Guyader in sod., 1996; Jiang in sod., 1999).

Preglednica 3-2: Nekatere značilnosti začetnih oligonukleotidov p290 in NVp110 (Le Guyader in sod., 1996; Jiang in sod., 1999).

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Mesto prileganja
p290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	4568 – 4591
NVp110	ACRATYTCATCATCACCATA	4865 – 4884

Y – C/T

R – A/T/G

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila sprva 37 °C, vendar smo jo zamenjali s 40,7 °C.

Za pozitivne kontrole smo uporabili RNK iz vzorcev človeških iztebkov 2069/04, 2084/04, 384/05 in enega vzorca govejega iztrebka KT16 (vzorci so bili predhodno potrjeni s sekveniranjem).

3.2.3.2.3 Optimizacija metode RT-PCR. Izbira pozitivne kontrole in določanje temperature prileganja začetnih oligonukleotidov p290 in NVp110

Za pozitivno kontrolo smo vzeli RNK iz vzorca prašičjega iztrebka 59. Osamili smo RNK in RT-PCR izvajali v termopomnoževalniku pri različnih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov v razponu od 38,5 °C do 44,1 °C. Pri vseh nastavljenih temperaturah nam je uspelo pomnožiti ustrezno velik odsek genoma. Za temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov smo izbrali temperaturo 40,7 °C, saj je bilo pri tej temperaturi najmanj nespecifičnih pridelkov pomnoževanja (Slika 3-1).

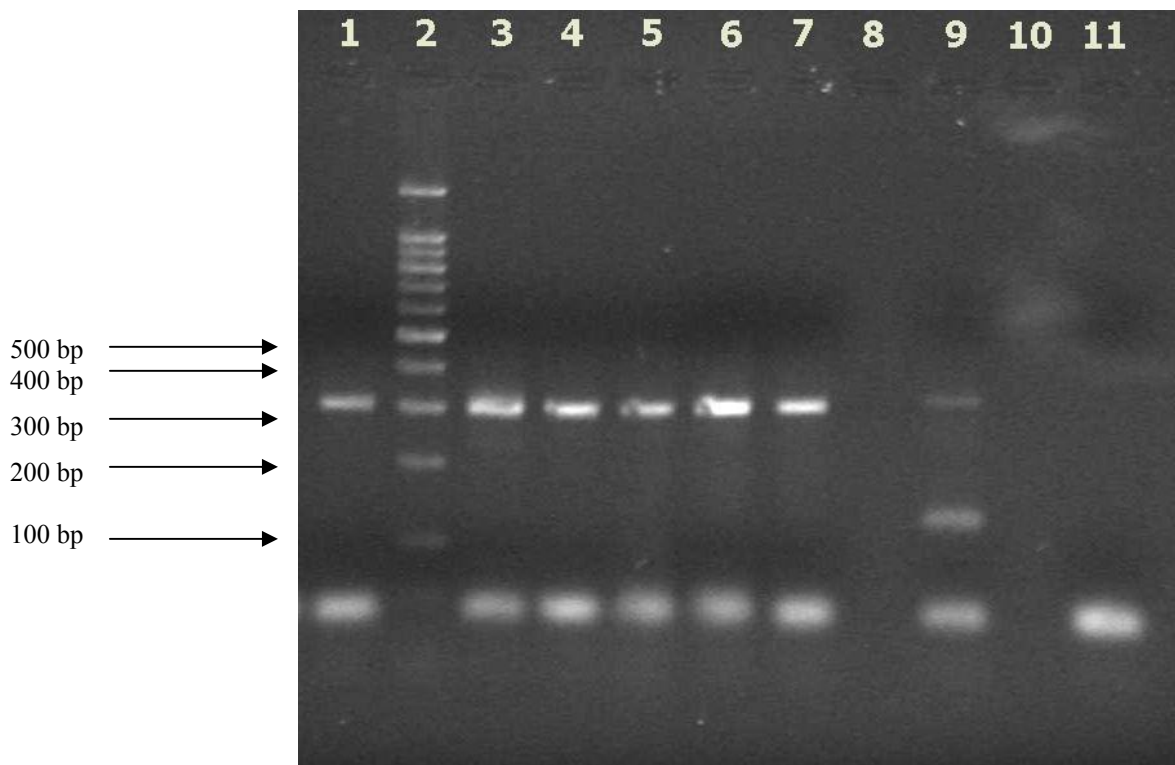
3.2.4 Analiza pridelkov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Pridelke PCR smo določali z elektroforezo v 2 % agaroznem gelu, ki smo ga pripravili iz 1 g agaroze in 50 ml 1x TAE pufra. Agarozo v 1x TAE pufri smo do vrelišča segreti v mikrovalovni pečici. Tekoči gel smo ohladili do približno 60 °C, dodali 5 µl etidijevega bromida (5 mg/ml) in premešali. Gel smo nalili na plastičen nosilec, kamor smo že prej namestili glavničke za vdolbinice. Odstranili smo morebitne mehurčke zraka, ki bi motili potovanje vzorcev po gelu. Popolnoma polimeriziran gel smo skupaj z nosilcem prestavili v kadičko za elektroforezo in dolili 1x TAE pufer tako, da je bil celoten gel prekrit s pufrom. Odstranili smo glavničke ter v vdolbinice nanесли vzorce in molekularni označevalec DNK po naslednjem postopku:

- 15 µl vzorca smo zmešali s 3 µl 6x nanašalnega pufra ter 15 µl mešanice nanесли v vdolbinico gela
- 5 µl molekularnega označevalca DNK smo zmešali s 3 µl 6x nanašalnega pufra in 5 µl nanесли v vdolbinico gela

Po nanosu vzorcev smo priklopili elektroforetsko kadičko z gelom na napajalnik, nastavili konstantno napetost 90 V in pustili teči 50 minut. Gel smo po končani elektroforezi

pregledali pod UV presvetljevalcem, posneli s kamero in z računalniškim programom gel dokumentirali.



Slika 3-1: Agarozni gel z nekaj vzorci pomnoženega tarčnega odseka genoma norovirusov s parom začetnih oligonukleotidov p290/NVp110 pri temperaturi prileganja 40,7 °C.

Legenda:

1, 3, 4, 5, 6, 7 – vzorci

2 – molekularni označevalec DNA (lestvica 100 bp)

9 – pozitivna kontrola

11 – negativna kontrola

Pozitiven rezultat je 316 bp velik pridelek pomnoževanja.

4 REZULTATI

4.1 ZNAČILNOSTI VZORCEV

Skupno smo pregledali 128 prašičjih iztrebkov zdravih živali. Od teh je bilo 71 vzorcev v zdruških, to pomeni da je bilo skupaj po pet vzorcev v enem združenem vzorcu. Devet združenih vzorcev je vsebovalo po 4 vzorce in dva združena po 2. Starost prašičev je bila od nekaj dni do 1 leta (Preglednica 4-1).

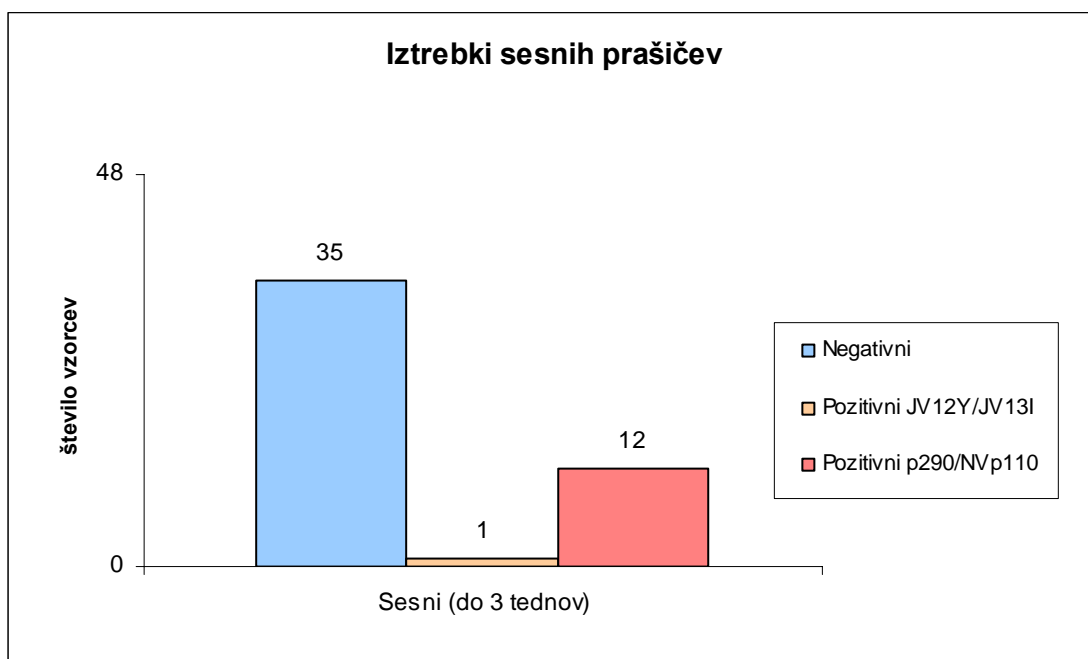
Preglednica 4-1: Starost prašičev z nekaterih slovenskih farm.

Starost prašičev	Število vzorcev (delež v %)
do 3 tednov (sesni)	48 (37,5)
3-10 tednov (odstavljeni)	38 (29,7)
nad 10 tednov (pitani)	42 (32,8)

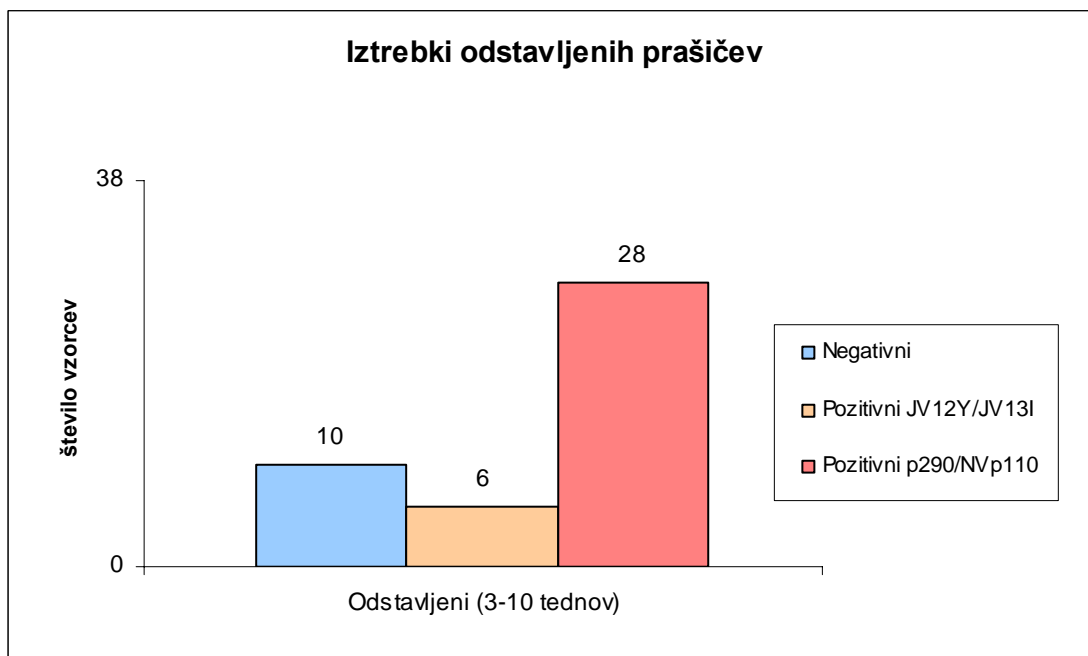
4.2 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA NOROVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR (Access RT-PCR System, Promega)

Testirali smo 128 vzorcev iz obdobja od januarja 2004 do januarja 2005. Velika večina jih je bila po reakciji pomnoževanja z RT-PCR negativna. Zaradi velikega števila negativnih rezultatov smo RNK pri vseh negativnih rezultatih razredčili z ddH₂O v razmerju 1:10 in ponovili pomnoževanje tarčnega odseka. V reakcijo smo vključili pozitivno in negativno kontrolo. Pozitivno kontrolo smo razredčili v razmerju 1:10 in je bila pri vseh sklopih reakcij pozitivna. Uporabili smo tudi negativno kontrolo, ki je bila v vseh sklopih reakcij negativna.

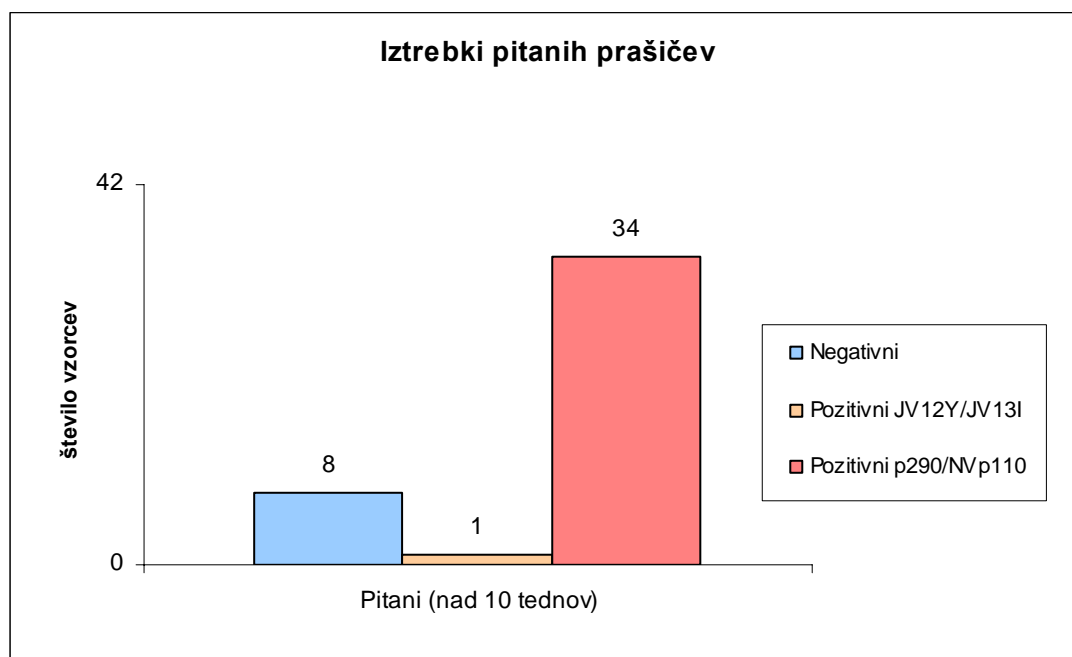
V skupini sesnih prašičev smo dobili s parom začetnih oligonukleotidov p290/NVp110 najmanj pozitivnih rezultatov; 12 (25%) od 48 vzorcev in enega s parom JV12Y/JV13I (2%) (Slika 4-1). Pri odstavljenih prašičih je bilo pozitivnih 28 (74%) od 38 vzorcev (Slika 4-2). Podobne rezultate smo dobili tudi pri pitanih prašičih, kjer smo dobili 34 (81%) pozitivnih vzorcev (Slika 4-3).



Slika 4-1: Rezultati pomnoževanja odseka genoma norovirusov z obema paroma začetnih oligonukleotidov v iztrebkih sesnih prašičev.



Slika 4-2: Rezultati pomnoževanja odseka genoma norovirusov z obema paroma začetnih oligonukleotidov v iztrebkih odstavljenih prašičev.



Slika 4-3: Rezultati pomnoževanja odseka genoma norovirusov z obema paroma začetnih oligonukleotidov v iztrebkih pitanih prašičev.

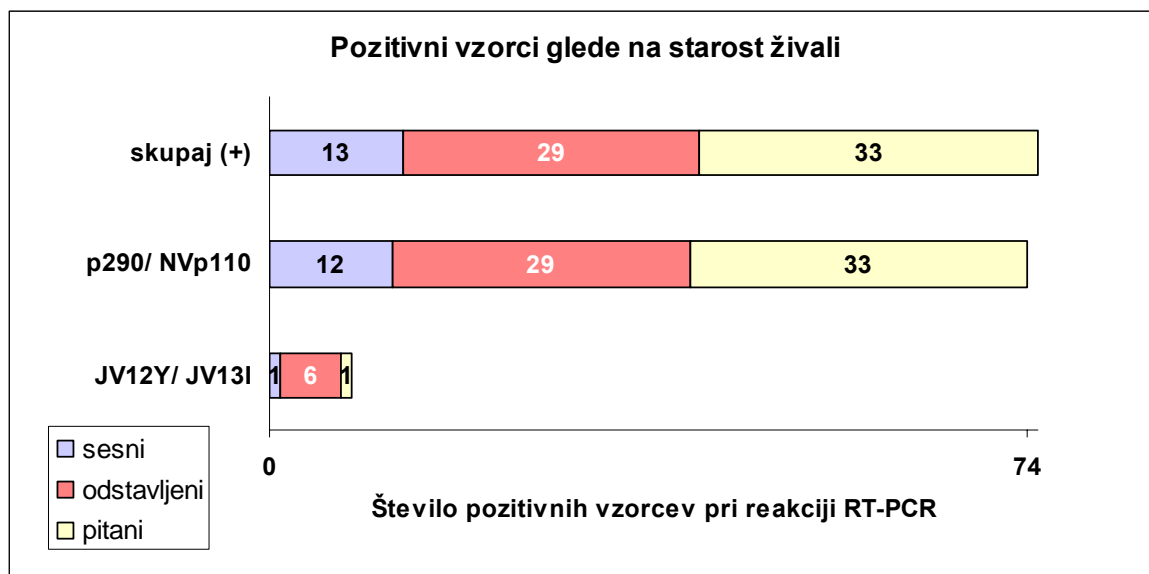
4.2.1 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi JV12Y/JV13I

S to reakcijo smo pomnoževali 326 bp dolg odsek. Reakcijo smo izvedli s programom, ki je opisan pod točko 3.2.3.2.1. Le pri 8 (6%) vzorcih od skupno 128 smo določili norovirusno RNK. Od 8 vzorcev, kjer smo RNK norovirusov določili z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I, samo v enem primeru nismo določili RNK norovirusov z drugim parom začetnih oligonukleotidov p290 in NVp110 (Slika 4-4).

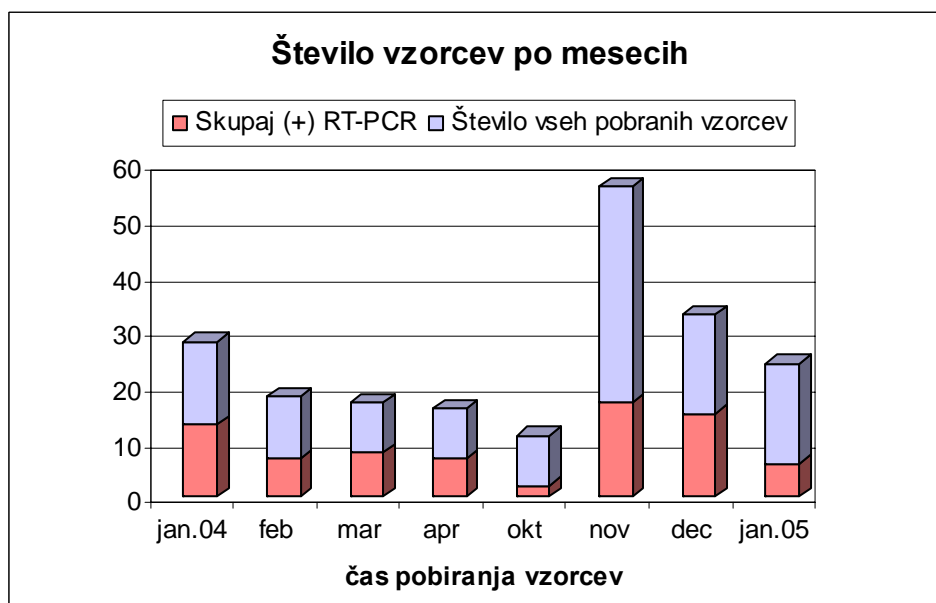
4.2.2 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi p290/NVp110

Reakcijo smo izvedli s programom, ki je opisan pod točko 3.2.3.2.2. Pri nekaterih vzorcih smo opazili pojavljanje nespecifičnih produktov pomnoževanja, dolgih okrog 400 bp do 600 bp, ki jih niti s spreminjanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov nismo uspeli odpraviti. Pri temperaturi 40,7 °C smo dobili najmanj nespecifičnih produktov. Virusno RNK smo določili v 74 (58%) od skupno 128 vzorcev. S parom p290/NVp110

smo uspeli določiti norovirusno RNK v več kot polovici vzorcev. Več pozitivnih vzorcev smo dobili v zimskih mesecih (Slika 4-5).



Slika 4-4: Primerjava rezultatov dobljenih z reakcijo RT-PCR, pri uporabi enega in drugega para začetnih oligonukleotidov.



Slika 4-5: Število pozitivnih vzorcev pri reakciji RT-PCR po mesecih.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Fekalno onesnaženje voda je lahko problematično pri množični reji farmskih živali, kot so govedo in prašiči. Ljudje so še do nedavnega veljali za edinega gostitelja norovirusov. Z molekularnim določanjem črevesnih kalicivirusov, kot sta Newbury agent-2 (Dastjerdi in sod., 1999) in virus Jena (Liu in sod., 1999) pri teletih, so odkrili genetsko sorodnost in večjo podobnost teh virusov z GGI človeških norovirusov kot s katerim koli drugim znanim kalicivirusom. Prav tako so sorodna nukleotidna zaporedja norovirusov iz združenih vzorcev farmskih telet, ki so jih določili v drugih raziskavah (van der Poel in sod., 2000). Filogenetske analize le-teh, ki temeljijo na delnih nukleotidnih zaporedjih RNK polimeraze, so pokazale, da tudi ta tvorijo skupek blizu zaporedja Newbury in so sorodne norovirusom iz GGI. Ker so bili vzorci vzeti z mnogih farm iz različnih regij, so zaključili, da je govedo običajen gostitelj norovirusov. Podobno genetsko povezavo so našli med nukleotidnimi zaporedji kalicivirusov pri prašičih, kjer so noroviruse dokazali tudi v raziskavah na Japonskem (Guo in sod., 1999). Tesna povezanost prašičjih in govejih črevesnih norovirusov s človeškimi norovirusi je nakazala možnost živalskega rezervoarja za človeške okužbe. Okužbe živali s človeškimi norovirusi še niso zabeležili kljub mnogim poskusom okužb različnih vrst živali z virusom Norwalk, z izjemo okužbe šimpanzev (Wyatt, 1978).

Vendar pa ti izsledki nikakor ne dokazujejo zoonotskega prenosa. Genetsko sorodni virusi so pri različnih vrstah običajni, brez očitnega širšega prenosa med vrstami, kot na primer pri rotavirusih. Primerjava nukleotidnih zaporedij polimeraznega dela RNK, celotnega kapsidnega zaporedja in ORF3 govejih kalicivirusov je pokazala, da so se nukleotidna zaporedja govejih kalicivirusov (BoCV) razlikovala od predstavnikov človeških norovirusov genske skupine I in II ter norovirusov, ki so v tistem času povzročali gastroenteritis med ljudmi v Veliki Britaniji (Oliver in sod., 2003). Največjo podobnost so zaznali med nukleotidnimi zaporedji polimeraznega dela, vendar pa je bila podobnost zaporedij med govejimi in človeškimi norovirusi iz GGI in GGII primerljiva tisti med genskima skupinama človeških norovirusov I in II. Prav tako niso našli norovirusnih

sevov, ki bi krožili tako med ljudmi kot živino. Raziskavo so zaključili z ugotovitvijo, da tvorijo nukleotidna zaporedja govejih kalicivirusov ločeno gensko skupino III znotraj rodu norovirusov in ljudi najverjetneje ne ogroža. Hkrati dodajajo, da bi bilo potrebno za ugotavljanje morebitnih okužb med vrstami zbrati več podatkov o zaporedjih kalicivirusov, ki krožijo med živino po vsem svetu. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi pri raziskavi kalicivirusov pri prašičih (Guo in sod., 1999), kjer so potrdili prašičje črevesne viruse (PEC). Ti so bili na osnovi primerjav polimeraznega dela nukleotidnih zaporedij bližje človeškemu sapovirusom kot drugim živalskim in človeškim kalicivirusom, vendar so tvorili ločeno gensko skupino. Tudi na Japonskem so našli nekaj sevov kalicivirusov pri prašičih, ki so sorodni norovirusom (Sugieda in sod., 1998). Oboji se strinjajo, da je potrebno narediti širše raziskave, ki bi zajele mnogo več podobnih zaporedij, da se pojasni njihov odnos do obstoječih človeških kalicivirusov. Tudi v Sloveniji lahko potrdimo prašičji črevesni virus (PEC), vendar pa zaenkrat nismo našli takih, ki bi bili sorodni človeškim sevom norovirusov.

Po drugi strani pa zoonotski prenos ne more biti izključen. Genetske razdalje med živalskimi in človeškimi norovirusi so podobne razdaljam med GGI in GGII sevi. Epidemično širjenje nekaterih norovirusnih sevov in pojavljanje enega prevladujočega seva v človeški populaciji v določenem letu spominja na zgodnje opise epidemij z virusom vezikularnega eksantema pri prašičih (VESV). Ta pripada drugemu rodu v družini kalicivirusov, vesivirusom, ki so znani po širokem spektru gostiteljev (Smith in sod., 1998). Občasne epidemije z virusom vezikularnega eksantema pri prašičih so kasneje povezali z oceanskim rezervoarjem (Smith in sod., 1998). Iz tega bi lahko sklepali, da so občasni prenosi norovirusov med vrstami možni. Občasne obsežne epidemije, ki jih povzroči en sev, so lahko posledica pojava novega norovirusnega seva iz živalskega rezervoarja (van der Poel in sod., 2000). V primeru, da obstajajo sevi človeških kalicivirusov znotraj genske skupine katere od živalskih kalicivirusov, je poleg zoonotskega prenosa tudi možnost nastanka rekombinant med človeškimi in prašičjimi kalicivirusi (Wang in sod., 2005).

5.1.1 Pomnoževanje tarčnih odsekov genoma norovirusov z enostopenjsko reakcijo RT-PCR

Z enostopenjsko reakcijo RT-PCR smo pomnoževali tarčne odseke polimeraznega dela norovirusne RNK. Najprej smo norovirusno RNK določali s pomnoževanjem tarčnega odseka z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I. RNK smo določili pri 8 vzorcih (6 %) od skupno 128. Nizek odstotek pozitivnih rezultatov z uporabo začetnih nukleotidov, ki so prirejani za človeške noroviruse, je v skladu z rezultati, ki so jih dobili v drugih podobnih raziskavah (Sugieda in sod., 1998; van der Poel in sod., 2000). Van der Poel in sodelavci so pri prašičih z uporabo začetnih oligonukleotidov JV13/JV12 le v 2 % vzorcev dobili ustrezno velik PCR produkt. Ker so z začetnimi oligonukleotidi, prirejenimi za človeške noroviruse, dobili nizko število pozitivnih vzorcev, so razvili specifične lovke, na podlagi nukleotidnih zaporedij dobljenih RT-PCR produktov. Po opravljenih filogenetskih analizah nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij so virus pri prašičih uvrstili v samostojno skupino znotraj GGII norovirusov, poleg tega so zaporedja močno podobna (94% za nukleotidna in 100% za aminokislinska zaporedja) prašičjim kalicivirusnim zaporedjem z Japonske.

Manj pozitivnih rezultatov pa je tudi posledica lažno negativnih rezultatov reakcije PCR. Največkrat omenjeni vzroki lažno negativnih rezultatov so nekvalitetna osamitev virusne RNK, inhibitorne snovi v reakcijski mešanici ter nepravilna izbira začetnih oligonukleotidov in pogojev pomnoževanja (Kitchin in Bootman, 1993; Poljak in sod., 1994). Možnost pojavljanja lažno negativnih rezultatov reakcije PCR lahko zmanjšamo z uporabo več parov začetnih oligonukleotidov, ki so specifični za različna področja genoma istega virusa (Persing, 1991; Poljak in sod., 1994).

Zaporedja, ki ne pripadajo kalicivirusom, temveč drugim mikrobom, ki se še nahajajo v črevesu prašičev, lahko ovirajo pomnoževanje norovirusnih in sapovirusnih zaporedij. V primeru majhne količine RNK v vzorcih je možno, da ne zaznamo prašičjih norovirusov in sapovirusov, predvsem pri subkliničnih okužbah prašičev. V primeru rekombinacij virusov pa obstaja možnost, da oligonukleotidni začetniki niso več enako občutljivi za mesto naleganja in posledica je prav tako manjše število pozitivnih rezultatov pri reakciji PCR.

Da bi se takim rekombinacijam izognili, smo za mesto naleganja izbrali najbolj ohranjen del genoma kalicivirusov, polimerazno regijo. Težave pri določanju norovirusne RNK lahko izvirajo tudi iz načina shranjevanja vzorcev, pri katerem je več različnih vzorcev iztrebkov združenih v enega.

Zaradi nizkega števila pozitivnih vzorcev, dobljenih z RT-PCR z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I, smo se odločili le-te zamenjati z drugim parom začetnih oligonukleotidov, p290 in NVp110. Ti nalegajo na polimeraznem delu genoma norovirusov, a z nekaj nukleotidov zamika glede na par JV12Y in JV13I in po podatkih iz literature lahko določijo tudi sapoviruse. V vseh vzorcih razen enem, kjer smo norovirusno RNK določili s pomnoževanjem z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I, smo norovirusno RNK določili tudi z začetnimi oligonukleotidi p290 in NVp110.

Z 10x redčenjem RNK za reakcijo RT-PCR smo dobili večje število pozitivnih rezultatov, kar pomeni, da so bile v vzorcih inhibitorne snovi. S povečanim razmerjem bi morda dobili še kakšen pozitiven rezultat več.

5.1.2 Značilnosti vzorcev

V literaturi navajajo, da je postopek združevanja vzorcev učinkovit in cenovno ugoden za shranjevanje velikega števila fekalnih vzorcev (Aldeen in sod., 1993) in lahko služi kot pregledni test za dokaz virusov v živalski populaciji. Od 128 združenih vzorcev, pri katerih smo določili norovirusno RNK, je pripadalo 13 sesnim (27,1%), 29 odstavljenim (76,3%) in 33 pitanim (78,6%) prašičem. Kalicivirusno RNK smo največkrat določili pri prašičih, starejših od 3 tednov. Pri starejših prašičih so kaliciviruse pogosteje določili tudi na Nizozemskem, saj so pri mlajših prašičih pogostejši drugi črevesni patogeni (van der Poel in sod., 2000). V raziskavi o navzočnosti norovirusov in sapovirusov pri prašičih različnih starosti v ZDA so prišli do podobnih rezultatov kot pri nas. Noroviruse so določili le pri zdravih pitanih prašičih, čeprav ne pri prašičih, starejših od enega leta. Sapoviruse so določili v vseh starostnih skupinah, od tega najmanj med sesnimi (21%) in največ med pitanimi (83%) (Wang in sod., 2006).

Vzorčili smo od januarja do aprila 2004 ter od oktobra 2004 do januarja 2005. Največ pozitivnih vzorcev smo določili novembra, decembra in januarja (Slika 4-5). Tudi sicer opisujejo več okužb v zimskih mesecih (Mounts in sod., 2000; Kovač, 2005).

Nekatere pozitivne vzorce so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete dodatno sekvenirali, vendar se nukleotidna zaporedja ne ujemajo z zaporedji človeških kalicivirusov, ampak sodijo v skupino prašičjih črevesnih virusov (PEC). Ker smo delali z vzorci zdravih živali, to kaže, da so ti virusi verjetno običajno navzoči in ne povzročajo bolezni. Potrebno bi bilo pregledati še obolele živali posameznih skupin.

5.2 SKLEPI

Pri delu smo ugotovili, da s parom začetnih oligonukleotidov p290 in NVp110 dobimo večje število pozitivnih rezultatov z metodo RT-PCR, ker z njimi določimo RNK tako norovirusov kot sapovirusov.

V nadaljevanju s sekveniranjem niso uspeli potrditi nukleotidnih zaporedij človeških norovirusnih sevov in s tem možnosti za zoonotski prenos teh virusov s prašičev nekaterih Slovenskih farm na človeka.

V prihodnje bi predlagali izbiro oligonukleotidnih začetnikov, ki nalegajo na mestu, kjer se združita polimerazni in kapsidni del genoma norovirusov, kot opisujejo Wang in sodelavci, ki so odkrili, da so nukleotidna zaporedja sapovirusov na tem delu genoma močno ohranjena med sevi znotraj vsake genske skupine. Začetne oligonukleotide bi prav tako izbrali glede na nukleotidna zaporedja virusov na našem območju.

Spremljali pa bi lahko tudi pojavljanje novih sevov pri farmskih živalih, saj bi v primeru pojava rekombinant med človeškimi in živalskimi norovirusi zoonotski prenos lahko razložili.

6 POVZETEK

Norovirusi povzročijo več kot 90% epidemičnih nebakterijskih primerov gastroenteritisa pri ljudeh. Ker je delež tako visok, je pomembno, da smo seznanjeni z vsemi možnimi potmi prenosa in varovalnimi ukrepi. Največ epidemij z norovirusi se pripeti zaradi okužbe s hrano in vodo ter posledično s prenosom med ljudmi. Fekalno-oralni prenos ter aerosoli pri bruhanju hitro in učinkovito razširijo virus, posebno ob slabi higieni, saj so norovirusni delci zelo odporni na okoljske vplive, za okužbo pa jih zadostuje že minimalno število.

Manj raziskana pot prenosa je iz živali na ljudi, bolj ogroženi pri tem pa so ljudje, ki so v pogostem stiku z živino, če je le-ta prenašalec sevov človeških kalicivirusov. Da bi ocenili možnost takšnega prenosa pri nas, smo zbrali vzorce z nekaterih Slovenskih farm prašičev in molekularno določili noroviruse v iztrebkih zdravih živali.

Naša raziskava je prva študija v Sloveniji, v okviru katere smo iskali kaliciruse pri prašičih. Skupno smo pregledali 128 združenih vzorcev. Z metodo RT-PCR smo pomnoževali tarčne odseke polimeraznega dela norovirusne RNK. Najprej smo norovirusno RNK pomnoževali z začetnimi oligonukleotidi JV13I in JV12Y ter noroviruse določili v 8 (6 %) združenih vzorcih. Zaradi nizkega števila pozitivnih rezultatov smo za pomnoževanje uporabili še dodaten par začetnih oligonukleotidov, NVp110 in p290, s katerim smo noroviruse določili v 74 (58%) združenih vzorcih.

Rezultati, ki smo jih dobili, so skladni z rezultati iz drugih raziskav, kjer so prav tako določili človeške kaliciruse v iztrebkih farmskih živali (van der Poel in sod., 2000). Navzočnost norovirusnih sevov pri zdravih prašičih smo potrdili, vendar so z nadaljnim sekveniranjem ugotovili, da se zaporedja teh sevov razlikujejo od zaporedij človeških norovirusov in po vsej verjetnosti sodijo k drugim norovirusom, ki se pojavljajo le pri prašičih.

7 VIRI

- 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
- Aldeen W.E., Whisenant J., Hale D., Matsen J., Carroll K. 1993. Comparison of pooled formalin-preserved specimens with three individual samples for detection of intestinal parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 144-145.
- Ando T., Jin Q., Gentsch J.R., Monroe S.S., Noel J.S., Dowell S.F., Cicirello H.G., Kohn M.A., Glass R.I. 1995a. 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., Monroe S.S., Gentsch J.R.; Jin Q., Lewis D.C., Glass R.I. 1995b. 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: 64-71
- Ando T., Noel J.S., Fankhauser R.L. 2000. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *Journal of Infectious Diseases*, 181: S336-348
- Atmar R.L., Estes M.K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 15-37
- Beuret C., Kohler D., Luthi T. 2000. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *Journal of Food Protection*, 63: 1576-1582

- Bridger J.C., Hall G.A., Brown J.F. 1984. Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infection and immunity*, 43: 133-138
- Burroughs J.N., Brown F. 1978. Presence of a 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 controle. *Lancet*, 343: 1240-1242
- Caul E.O. 1996. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. 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
- Clarke I.N., Lambden P.R., Caul E.O. 1998. 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: 511-535
- Clarke I.N., Lambden P.R. 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 309-316
- Cubitt W.D., Jiang X.Y., Wang J., Estes M.K. 1994. Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. *Journal of Medical Virology*, 43: 252-258
- Dastjerdi A.M., Green J., Gallimore C.I., Brown D.W., Bridger J.C. 1999. The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology*, 254: 1-5

- 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
- Elektronsko mikroskopski posnetek kalicivirusov. Interno gradivo. 2005. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo: EMD 040730
- 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
- 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 J., Henshilwood K., Gallimore C.I., Brown D.W., 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: 858-863
- 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., Ando T., Balayan M., Berke T., Clarke I., Estes M., Matson D., Nakata S., Neill J., Studdert M., Thiel H. 2000. Taxonomy of caliciviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S322-330
- Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neil J.D., Studdert M.J., Thiel H.Y. 2002. ICTVdb index of viruses. New York. International Committee on Taxonomy of Viruses (28. junij 2002) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm> (20.julij 2006): 3 str.
- Greenberg H.B., Valdesuso J., Kalica A.R., Wyatt R.G., McAuliffe V.J., Kapikian A.Z., Chanock R.M. 1981. Proteins of Norwalk virus. *Journal of Virology*, 37: 994-999
- Guo M., Chang K.-O., Hardy M.E., Zhang Q., Parwani V., Saif L.J. 1999. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *Journal of Virology*, 73: 9625-9631
- Guo M., Hayes J., Cho K.O., Parwani V., Lucas L.M., Saif L.J. 2001. Comparative pathogenesis of tissue culture adapted and wild type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild type PEC. *Journal of Virology*, 75: 9239-9251

- 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: S275-280
- Jiang X., Graham D.J., Wang K.N., Estes M.K. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, 250: 1580-1583
- Jiang X., Wang J., Graham D.J., Estes M.K. 1992a. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2529-2534
- Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. 1992b. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, 66: 6527-6532
- Jiang X., Graham D.J., Wang K.N., Estes M.K. 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 195: 51-61
- 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 Viral Methods*, 78: 81-91

-
- 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
- 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
- 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: 1329-32
- Kitchin P.A., Bootman J.S. 1993. Quality control of the polymerase chain reaction. *Medical Virology*, 3: 107-114
- Kojima S., Kageyama T., Fukushi S., Fuminori B., 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., 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., von Bonsdorff C.-H., Vinje J., de Medici D., Monroe S. 2002a. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 187-205
- Koopmans M., van Strien E., Vennema H. 2002b. 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: 1-65
- Lambden P.R., Caul E.O., Ashley C.R., Clarke I.N. 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*, 259: 516-519
- Le Guyader F., Estes M.K., Hardy M.E., Neill F.H., Green J., Brown D.W., Atmar R.L. 1996. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Archives of Virology*, 141: 2225-2235
- 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 the Norwalk-like viruses. *Archives of Virology*, 140: 1345-1356
- Liu B.L., Lambden P.R., Günther H., Otto P., Elschner M., Clarke I.N. 1999. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *Journal of Virology*, 73: 819-825
- 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

Madeley C.R., Cosgrove B.P. 1976. Letter: caliciviruses in man. *Lancet*, 1: 199-200

Madeley C.R. 1979. Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of faeces by electron microscopy. *Journal of Infectious Diseases*, 139: 519-523

Matson D.O., Zhong W.M., Nakata S., Numata K., Jiang X., Pickering L.K., Chiba S., Estes M.K. 1995. Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *Journal of Medical Virology*, 45: 215-222

Matthews R.E. 1979. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 12: 129-296

Maunula L., Piiparinen H., von Bonsdorff C.H. 1999. Confirmation of Norwalk-like virus amplicons after RT-PCR by microplate hybridization and direct sequencing. *Journal of Virological Methods*, 83: 125-134

Moe C.L., Gentsch J., Ando T., Grohmann G., Monroe S.S., Jiang X., Wang J., Estes M.K., Seto Y., Humphrey C. in sod. 1994. Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 642-648

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

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

- Numata K., Hardy M.E., Nakata S., Chiba S., Estes M.K. 1997. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Archives of Virology*, 142: 1537-1552
- Oliver S.L., Dastjerdi A.M., Wong S., El-Attar L., 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: 2789-2798
- 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. *The New England Journal of Medicine*, 297: 86-89
- Persing D.H. 1991. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1281-1285
- 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., Rothnagel R., Jiang X., Estes M.K. 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. Journal of Virology, 68: 5117-5125
- Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science, 286: 287-290
- 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

Saif L.J., Bohl E.H., Theil K.W., Cross R.F., House J.A. 1980. Rotavirus-like, calicivirus-like and 23 nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 12: 105-111

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 intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 129: 705-708

Schreier E., Doring F., Kunkel U. 2000. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Archives of Virology*, 145: 443-453

Smit 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

Smith A.W., Skilling D.E., Cherry N., Mead J.H., Matson D.O. 1998. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerging Infectious Disease*, 4: 13-20

Sugieda M., Nagaoka H., Kakishima Y., Ohshita T., Nakamura S., Nakajima S. 1998. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Archives of Virology*, 143: 1215-21

Sugieda M., Nakajima S. 2002. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus »Norwalk-like viruses«. *Virus Research*, 87: 165-172

-
- Thiel H.-J., König M. 1999. Caliciviruses: an overview. *Veterinary Microbiology*, 69: 55-62
- 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. The US Department of Agriculture. (september 2003)
http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/taf/emerginganimalhealthissues_files/caliciviruspaperreg.pdf (20. junij 2006) 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., Koopmans M. 1996. Molecular detection and epidemiology of NLV in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Journal of Infectious Diseases*, 174: 610-615
- 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 H., van der Heide R., Lewis D., Hedlund K.O., Svensson L., Koopmans M.P. 2000a. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 530-536

- Vinje J., Green J., Lewis D.C., Gallimore C.I., Brown D.W.G., Koopmans M.P.G. 2000b. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Archives of Virology*, 145: 223-241
- 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
- Wang Q.-H., Souza M., Funk J.A., Zhang W., Saif L.J. 2006. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and Microwell hybridization assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2057-2062
- Wright P.J., Gunesekere I.C., Doultree J.C., Marshall J.A. 1998. Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980-1996. *Journal of Medical Virology*, 55: 312-320
- Wyatt R.G., Greenberg H.B., Dalgard D.W., Allen W.P., Sly D.L., Thornhill T.S., Chanock R.M., Kapikian A.Z. 1978. Experimental infection of chimpanzees with the Norwalk agent of epidemic viral gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, 2: 89-96