UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

Urška Henigman

UGOTAVLJANJE PATOGENIH BAKTERIJ IN VIRUSOV V ŠKOLJKAH SLOVENSKEGA MORJA IN NJIHOVA GENETSKA KARAKTERIZACIJA

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 594.124:579.84:575.22:57.083(043.3)

Urška Henigman, dr. vet. med.

UGOTAVLJANJE PATOGENIH BAKTERIJ IN VIRUSOV V ŠKOLJKAH SLOVENSKEGA MORJA IN NJIHOVA GENETSKA KARAKTERIZACIJA

Doktorska disertacija

DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA AND VIRUSES IN MUSSELS FROM SLOVENIAN COASTAL WATERS AND THEIR GENETIC CHARACTERIZATION

Doctoral thesis

Ljubljana, 2012

Urška Henigman

UGOTAVLJANJE PATOGENIH BAKTERIJ IN VIRUSOV V ŠKOLJKAH SLOVENSKEGA MORJA IN NJIHOVA GENETSKA KARAKTERIZACIJA

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za higieno živil in bromatologijo ter Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Predstojnica Inštituta za higieno živil: prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik
Predstojnik Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo: znan. sod. dr. Brane Krt

Mentorica: **prof. dr. Darja Barlič Maganja, Inštitut za varovanje zdravja, Ljubljana**
Somentor: **doc. dr. Andrej Kirbiš, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za higieno živil, Ljubljana**

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: **prof. dr. Peter Hostnik, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo**
Članica: **prof. dr. Vlasta Jenčič, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za zdravstveno varstvo divjadi, rib in čebel**
Član: **prof. dr. Srečko Koren, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo**

Javni zagovor je bil opravljen:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka: Urška Henigman

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE ..... **V**
KAZALO SLIK ..... **X**
KAZALO TABEL ..... **XII**
KAZALO PRILOG ..... **XIV**
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI ..... **XV**
IZVLEČEK ..... **XVII**
ABSTRACT ..... **XVIII**

1 UVOD **19**
1.1 Namen raziskave 21
1.2 Hipoteze 21

2 PODATKI IZ LITERATURE **22**
2.1 Severno Jadransko morje 22
2.2 Školjke 24
2.2.1 Gojenje 24
2.2.2 Klasifikacija, anatomija in fiziologija klapavic 27
2.3 Mikrobiološko onesnaženje školjk 29
2.4 Bakterija *Vibrio parahaemolyticus* 30
2.4.1 Odkritje in poimenovanje 30
2.4.2 Morfologija in fiziologija bakterijske celice 30
2.4.3 Razširjenost 31
2.4.4 Patogenost in virulenčni dejavniki 31
- Termostabilen direktni hemolizin (TDH) 32
- Termostabilnemu hemolizinu soroden (*angl. related*) hemolizin TRH 33
- Drugi virulenčni dejavniki 33
2.4.5 Ugotavljanje bakterije *V. parahaemolyticus* 34
- Gojiščna bakteriološka preiskava 34
- Molekularno potrjevanje 34
2.4.6 Klinična oblika obolenj 35
2.4.7 Epidemiologija 36

2.4.8 Zakonodaja 36
2.5 Verotoksična bakterija *E. coli* 37
2.5.1 Odkritje in poimenovanje 37
2.5.2 Morfologija 37
2.5.3 Razširjenost 39
2.5.4 Patogenost in virulenčni dejavniki 39
2.5.5 Klinična slika in vir okužbe 42
2.5.6 Epidemiologija 42
2.5.7 Zakonodaja in pristopi ugotavljanja VTEC v živilih 44
2.6 Norovirusi 45
2.6.1 Odkritje in poimenovanje 45
2.6.2 Klasifikacija 45
2.6.3 Zgradba norovirusnega genoma 49
2.6.4 Razširjenost okužb z norovirusi 50
2.6.5 Klinični znaki in vir okužbe 50
2.6.6 Patogeneza 51
2.6.7 Epidemiologija 52
2.6.8 Diagnostika 52
2.6.9 Zakonodaja 53
2.7 Virus hepatitisa A 54
2.7.1 Odkritje in poimenovanje 54
2.7.2 Klasifikacija 54
2.7.3 Zgradba genoma 55
2.7.4 Razširjenost 56
2.7.5 Patogeneza in klinični znaki 57
2.7.6 Epidemiologija 57
2.7.7 Diagnostika 60
2.7.8 Zakonodaja 60

3 MATERIALI IN METODE 61
3.1 VZORCI 61
3.1.1 Vzorci za preiskavo na *V. parahaemolyticus* 62
3.1.2 Vzorci za ugotavljanje prisotnosti bakterije VTEC in njenih toksinov 62

3.1.3 Vzorci za ugotavljanje prisotnosti virusov 62
3.2 METODE 63
Priprava vzorcev 64
3.3 Preiskava na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* 64
3.3.1 Priprava vzorcev in izolacija na klasičnem mikrobiološkem gojišču 64
3.3.2 Biokemijska potrditev 66
3.3.3 Ugotavljanje bakterije *V. parahaemolyticus* iz kolonij, izoliranih na agarju TCBS, in iz obogatitvenega bujona z molekularno metodo: 66
- Izolacija DNA iz bakterijske kolonije 66
- Izolacija DNA iz obogatitvenega gojišča 66
- Verižna reakcija s polimerazo 67
3.3.4 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) produktov verižne reakcije s polimerazo 68
3.4 Preiskava na prisotnost verotoksične bakterije *E. coli* 69
3.4.1 Ugotavljanje verotoksinov 69
3.4.2 Ugotavljanje prisotnosti verotoksične *E. coli* po ISO 16654:2001 71
3.5 Ugotavljanje norovirusov 74
3.5.1 Izolacija celokupne RNA 74
- Izolacija s komercialnim paketom PureLink™ Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen, ZDA) 74
A Opis postopka po navodilih proizvajalca 74
B Modificirana metoda 75
- Izolacija s komercialnim paketom RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija) 77
3.5.2 Merjenje koncentracije nukleinskih kislin 77
- Spektrofotometrično 77
- Fluorometrično 77
3.5.3 Metoda reverzne transkripcije s sledečo verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. real time RT-PCR) 78
- Obdelava rezultatov 79
3.5.4 Metoda reverzne transkripcije s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (angl. RT-PCR) ali klasična RT-PCR 81
3.5.5 Elektroforeza v agaroznem gelu 83
3.5.6 Določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) produktov verižne reakcije s polimerazo 84

- Čiščenje produktov 84
- Sekvenciranje odseka za polimerazni del (ORF1) in kapsidni del (ORF2) genoma. 84
3.6 Ugotavljanje virusa hepatitisa A 89
3.6.1 Metoda RT-PCR v realnem času 89
3.6.2 Klasična metoda RT-PCR 90
3.6.3 Elektroforeza v agaroznem gelu 91

4 REZULTATI 92
4.1 Dokaz bakterije *V. parahaemolyticus* 92
4.2 Verotoksična bakterija *E. coli* 97
4.3 Norovirusi 98
4.3.1 Izolacija nukleinskih kislin 98
4.3.2 Preverjanje koncentracije nukleinskih kislin 98
4.3.3 Dokazovanje virusne RNA z metodo RT-PCR v realnem času 99
- Pomnoževanje tarčnega odseka genoma norovirusov na stiku ORF1-ORF2 100
4.3.4 Dokazovanje norovirusne RNA s klasično metodo RT-PCR 103
4.3.4.1 Pomnoževanje odseka gena za polimerazo (ORF1) 103
4.3.4.2 Pomnoževanje kapsidnega odseka genoma (ORF2) 107
- A) Genska skupina I 107
- B) Genska skupina II 108
4.3.5 Filogenetska analiza nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij 109
- A) Filogenetska analiza polimeraznega dela genoma 109
- B) Filogenetska analiza kapsidnega dela genoma 113
4.3.6 Primerjava ugotovljene norovirusne RNA glede na metode detekcije 115
4.4 Virus hepatitisa A 116

5 RAZPRAVA 117
5.1 Bakterija *V. parahaemolyticus* 117
5.2 Verotoksična bakterija *E. coli* 120
5.3 Norovirusi 123
5.4 Virus hepatitisa A 128

6 SKLEPI 130

7 POVZETEK 132

8 SUMMARY 135

9 ZAHVALA 138

10 LITERATURA 139

11 PRILOGE 174

KAZALO SLIK

Slika 1: Morski tokovi v Tržaškem zalivu 23
Slika 2: Zemljevid obale s prostori za školjčišča 24
Slika 3: Sredozemska klapavica (*M. galloprovincialis*)..... 25
Slika 4: Gojenje klapavic na vrveh v slovenskem morju 26
Slika 5: Gojenje klapavic (*fr. bouchot*) v Franciji..... 27
Slika 6: Gojenje klapavic (*fr. bouchot*) v Franciji..... 27
Slika 7: Shema zgradbe klapavice..... 28
Slika 8: Mikroskopski preparat bakterije *V. parahaemolyticus*, pobarvan po Gramu 30
Slika 9: Mikroskopski preparat bakterije *E. coli*, pobarvan po Gramu..... 38
Slika 10: Shematski prikaz genov EHEC..... 41
Slika 11: Elektronsko mikroskopski posnetek norovirusnih virionov 46
Slika 12: Filogenetska razvrstitev norovirusov..... 48
Slika 13: Shematski prikaz norovirusnega genoma 49
Slika 14: Elektronski posnetek virusa hepatitisa A 54
Slika 15: Shematski prikaz genoma in proteinov virusa hepatitisa A z regijami..... 56
Slika 16: Incidenčna stopnja hepatitisa A v Sloveniji..... 58
Slika17: Časovna razporeditev ugotovljenih primerov hepatitisa A v državah EU v letih 2006–2008 59
Slika 18: Kolonije *V. parahaemolyticus* na agarju TCBS..... 92
Slika 19: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja s PCR in začetnima oligonukleotidoma toxR/toxF 94
Slika 20: Rezultati testa ELISA (RIDASCREEN® Verotoxin, R–Biopharm, Nemčija) 97
Slika 21: Rezultat pomnoževanja z RT-PCR v realnem času 99
Slika 22: Pregled vzorcev, pozitivnih na norovirusno RNA z RT-PCR v realnem času 102
Slika 23: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnima oligonukleotidoma JV12Y/JV13I 103
Slika 24: Primer kromatogramskega zapisa odseka RdRp iz vzorca z Debelega rtiča 106
Slika 25: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij produktov sekvenciranja 106
Slika 26: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnimi oligonukleotidi G1SKF/G1SKR 107
Slika 27: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij produktov sekvenciranja 108

Slika 28: Filogenetsko drevo norovirusnih sevov, pripravljeno po metodi sosedskega odnosa aminokislinskega zaporedja na delu gena RdRp 110

Slika 29: Filogenetsko drevo norovirusnih sevov, pripravljeno po metodi sosedskega odnosa aminokislinskega zaporedja na odseku gena RdRp 112

Slika 30: Filogenetsko drevo norovirusnih sevov, pripravljeno po metodi sosedskega odnosa aminokislinskega zaporedja na delu gena RdRp 114

Slika 31: Grafična primerjava deležev ugotovljenih norovirusov z različnimi oligonukleotidnimi začetniki po genskih skupinah 115

Slika 32: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnimi oligonukleotidi H1/H4 116

KAZALO TABEL

Tabela 1: Število in vrsta izvedenih preiskav v posameznih letih 61

Tabela 2: Število opravljenih preiskav vzorcev školjk na prisotnost *V. parahaemolyticus* glede na področje rasti in leto izvedbe 62

Tabela 3: Število opravljenih preiskav vzorcev na verotoksine oziroma *E. coli* iz posameznih školjčišč prosto nabranih školjk v letih testiranja 62

Tabela 4: Preiskane školjke na prisotnost norovirusov in virusa hepatitisa A iz posameznih školjčišč prosto nabranih školjk v letih testiranja 63

Tabela 5: Sestava gojišča TCBS 65

Tabela 6: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje genov *V. parahaemolyticus* 68

Tabela 7: Sestava gojišča m-TSB 69

Tabela 8: Sestavine PBS-Tween 71

Tabela 9: Sestava pufra za spiranje (PBS-Tween) 72

Tabela 10: Sestava gojišča SMAC 73

Tabela 11: Pregled referenčnih sevov norovirusov in virusa hepatitisa A, ki smo jih uporabili kot pozitivne kontrole 76

Tabela 12: Začetni oligonukleotidi in sonde za ugotavljanje norovirusov z RT-PCR v realnem času 80

Tabela 13: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje norovirusov z RT-PCR in njihove značilnosti 81

Tabela 14: Seznam sevov norovirusov, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF1 85

Tabela 15: Seznam sevov norovirusov iz Slovenije, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF1 86

Tabela 16: Seznam sevov norovirusov, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF2 87

Tabela 17: Začetni oligonukleotidi in lovka za ugotavljanje virusa hepatitisa A z RT- PCR v realnem času 90

Tabela 18: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje virusa hepatitisa A z metodo RT-PCR ... 91

Tabela 19: Rezultati molekularnih in klasičnih preiskav v letih 2006–2008 93

Tabela 20: Vzorci klapavic, ki smo jih v letu 2006 preiskali na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* 95

Tabela 21: Vzorci klapavic, ki so bili v letih 2007 in 2008 preiskani na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* 96

Tabela 22: Pregled rezultatov testiranj školjk na prisotnost norovirusov z RT-PCR v realnem času 100

Tabela 23: Pomnoževanje tarčnega odseka genoma norovirusov na stiku ORF1-ORF2 101

Tabela 24: Rezultati pomnoževanja genoma norovirusov s klasično metodo RT-PCR 105

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Podobnosti (%) norovirusnih nukleotidnih zaporedij med sevi, izoliranimi iz školjk, in sevi iz genske baze odseka RdRp norovirusnega genoma 174

Priloga 2: Podobnosti (%) norovirusnih aminokislinskih zaporedij med sevi, izoliranimi iz školjk, in sevi iz genske baze odseka RdRp norovirusnega genoma 175

Priloga 3: Podobnosti (%) norovirusnih nukleotidnih zaporedij med sevi, izoliranimi iz školjk, vode in kliničnih primerov 176

Priloga 4: Podobnosti (%) norovirusnih aminokislinskih zaporedij med sevi, izoliranimi iz školjk, vode in kliničnih primerov 177

Priloga 4: Podobnosti (%) norovirusnih aminokislinskih zaporedij med sevi, izoliranimi iz školjk, vode in kliničnih primerov 178

Priloga 6: Podobnosti (%) norovirusnih aminokislinskih zaporedij kapsidnega dela norovirusnega genoma 179

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AEEC	pritrditvene in prepisovalske *E. coli* (*angl. attaching and effacing E. coli*)
APW	alkalna peptonska voda (*angl. alkaline peptone water*)
BHQ	nefluorescenčni dušilec (*angl. black hole quencher*)
bp	bazni par
cDNA	komplementarna DNA (*angl. complementary DNA*)
CFU	kolonijska enota (*angl. colony-forming unit*)
Ct	cikel praga detekcije (*angl. cycle treshold*)
DAEC	difuzno adherentne *E. coli* (*angl. diffuse-adhering E. coli*)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
EaggEC	enteroagregativne *E. coli* (*angl. enteroaggregative E. coli*)
ECDC	Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (*angl. European Centre for Disease Prevention and Control*)
E. coli	*Escherichia coli*
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (*angl. European Food Safety Agency*)
EIEC	enteroinvazivne *E. coli* (*angl. enteroinvasive E. coli*)
EHEC	enterohemoragične *E. coli* (*angl. enterohaemorrhagic E. coli*)
EPEC	enteropatogene *E. coli* (*angl. enteropathogenic E. coli*)
ETEC	enterotoksigene *E. coli* (*angl. enterotoxigenic E. coli*)
EU	Evropska unija
GG	genska skupina (*angl. genogroup*)
HBGA	človeški krvnoskupinski antigeni (*angl. Human Blood Group Antigens*)
HUS	hemolitični uremični sindrom
KP	pojav kanagawa (*angl. Kanagawa phenomenon*)
LPS	lipopolisaharid
MPN	najverjetnejše število (*angl. most probable number*)
ORF	bralni okvir (*angl. open reading frame*)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (*angl. polymerase chain reaction*)
RdRp	od RNA odvisna polimeraza RNA (*angl. RNA dependent RNA polymerase*)
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	reverzna transkripcija s sledečo verižno reakcijo s polimerazo

SLTEC	*E. coli*, ki proizvaja toksin, podoben šigovemu (*angl. shiga like toxin E. coli*)
SNA	slani hranilni agar (*angl. saline nutrient agar*)
Taq	»*Thermus aquaticus*«
TCBS	tiosulfatni citratni agar z žolčnimi solmi in saharozo (*angl. thiosulfate citrate bile salt sucrose*)
TDH	termostabilni direktni hemolizin (*angl. thermostable direct hemolysin*)
TRH	termostabilnemu hemolizinu soroden hemolizin (*angl. thermostable-related hemolysin*)
VBNC	živo, vendar nekultivabilno stanje celic (*angl. viable but nonculturable*)
VTEC	verotoksična *E. coli* (*angl. verotoxigenic E. coli*)

UGOTAVLJANJE PATOGENIH BAKTERIJ IN VIRUSOV V ŠKOLJKAH SLOVENSKEGA MORJA IN NJIHOVA GENETSKA KARAKTERIZACIJA

IZVLEČEK

Ključne besede: hrana, onesnaževanje — analize; školjke — mikrobiologija; Mytilus — virologija; Vibrio parahaemolyticus; Escherichia coli; norovirus; hepatitis A virus; RNA virusna — izolacija in čiščenje; verižna rekcija s polimerazo; Slovenija

V obdobju od leta 2006 do leta 2008 smo v vzorcih mediteranskih klapavic (*Mytilus galloprovincialis*) ugotavljali prisotnost bakterij *V. parahaemolyticus* in bakterij *E. coli*, ki izločajo verotoksin, ter norovirusov in virusa hepatitisa A. Proučevali smo školjke iz vseh treh slovenskih školjčišč, Seče, Strunjana in Debelega rtiča, ter manjše število prostoživečih školjk iz področja Pirana. Vzorčenje je potekalo čez vse leto. Z raziskavo smo želeli ugotoviti stopnjo mikrobiološke in virusne kontaminacije školjk; le-ta je bila v slovenskem prostoru praktično neraziskana. Preiskave na posamezne parametre smo izvajali z uporabo klasičnih mikrobioloških in molekularnih metod. Dobljeni rezultati potrjujejo pričakovane razlike med uspešnostjo metod za dokazovanje bakterij in virusov v školjkah.

S klasično gojiščno preiskavo smo v 0,6 % vzorcev (1/168) dokazali bakterijo *V. parahaemolyticus*. V istih vzorcih smo z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo ugotovili prisotnost *V. parahaemolyticus* pri 14,2 % (24/168) vzorcev. Dokazovanje smo izvajali iz predobogatitvenih gojišč in potrdili vrstno specifična gena *toxR* in *tlh*. V 0,6 % vzorcev (1/168) smo dokazali tudi gen za hemolizin *trh*.

Bakterije E. coli, ki izloča verotoksin, z imunomagnetno separacijo nismo ugotovili. Prav tako z encimskoimunskim testom ELISA (Ridascreen® Verotoxin, Nemčija) nismo dokazali toksinov VT1 in VT2.

V preiskanih vzorcih školjk z molekularnimi metodami nismo potrdili prisotnosti virusa hepatitisa A.

Z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) smo v vzorcih školjk ugotovili prisotnost norovirusne RNA. S klasično metodo RT-PCR smo dokazali norovirusno RNA v 18 od 168 (10,7 %) vzorcev. Z metodo RT-PCR v realnem času pa smo RNA norovirusov dokazali v 28 od 168 (16,7 %) vzorcev.

S študijo smo v mediteranskih klapavicah, nabranih v slovenskem morju, potrdili prisotnost bakterij *V. parahaemolyticus*, prav tako smo dokazali tudi prisotnost norovirusov, medtem ko verotoksične bakterije *E. coli* in virusov hepatitisa A nismo potrdili. Kljub temu da so slovenske školjke pogosto onesnažene z bakterijami *E. coli*, ki so pokazatelj fekalne onesnaženosti morja, z uporabljeno imunomagnetno metodo verotoksičnih sevov *E. coli* nismo dokazali. Za dokazovanje *V. parahaemolyticus* smo razvili molekularno metodo PCR. Z njo smo uspeli dokazati bakterije tudi v vzorcih školjk, ki so bili z gojiščno preiskavo negativni. Virusov hepatitisa A v školjkah nismo dokazali. To lahko povezujemo z dejstvom, da je teh okužb med prebivalci Slovenije zanemarljivo malo. Med prebivalci so pogoste okužbe z norovirusi, zato ne preseneča, da smo jih dokazali tudi v slovenskih školjkah. Najpogosteje smo dokazali gensko skupino II.4, podskupino 2006b. Glede na lokacijo školjčišč je bila norovirusna RNA največkrat prisotna v klapavicah iz školjčišča na Debelem rtiču (tu je bil tudi najpestrejši nabor norovirusnih sevov) in v prosto živečih klapavicah iz okolice Pirana. Dobljene rezultate povezujemo z lego našega najsevernejšega gojišča; glavni morski tok prinaša s seboj velike količine nečistoč, v tem delu je zelo intenziven ladijski promet, veliko je izpustov voda in izlivov rek. Vse to povzroča kontaminacijo morske vode in posledično tudi školjk na tem področju z genetsko različnimi norovirusi.

DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA AND VIRUSES IN MUSSELS FROM SLOVENIAN COASTAL WATERS AND THEIR GENETIC CHARACTERIZATION

ABSTRACT

Key words: food contamination — analysis; shellfish — microbiology; Mytilus — virology; Vibrio parahaemolyticus; Escherichia coli; norovirus; hepatitis A virus; RNA, viral — isolation and purification; polymerase chain reaction; Slovenia

In the period from 2006 to 2008, samples of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were examined for the presence of *V. parahaemolyticus*, verotoxigenic *E. coli*, noroviruses and hepatitis A virus. Mussels were collected in three harvesting areas in Slovenia: Seča, Strunjan and Debeli rtič. A small number of wild mussels were collected from the area of Piran. Sampling was conducted throughout the year. The goal of our study was to determine the level of microbial and viral contamination of shellfish from Slovenian coastal waters, which has been basically unexplored to date. Investigations on individual parameters were performed using classical microbiological and molecular methods. Our results confirm expected differences in the performance of tests for bacteria and viruses.

V. parahaemolyticus was isolated in 0.6 % of samples (1/168) with a culture medium. Species-specific genes *toxR* and *tlh* were detected in 14.2 % (24/168) of samples from pre-enrichment, using polymerase chain reaction. The hemolizin *trh* gene was found in 0.6 % of samples.

Verotoxigenic *E. coli* was not found by immunomagnetic separation. Toxins VT1 and VT2, were also not found by the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA (Ridascreen® Verotoxin, Germany).

Hepatitis A virus was not detected by molecular methods in the samples of Mediterranean mussels.

Real time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR) also detected the presence of norovirus RNA. RT-PCR detected the RNA dependent RNA polymerase gene of noroviruses in 18 out of 168 samples, or 10.7 %. Real time RT-PCR detected RNA of noroviruses in 28 out of 168 samples, or 16.7 %.

In our study on Mediterranean mussels collected along the Slovenian coast, we confirmed the presence of *V. parahaemolyticus* and also detected noroviruses, while verotoxic *E. coli* and hepatitis A virus were not detected. Despite the fact that *E. coli* is often present in mussels from Slovenian coastal waters, which indicates faecal contamination, verotoxic strains were not detected by immunomagnetic separation in our study. We developed a polymerase chain reaction for the detection of *V. parahaemolyticus*. Using this method, we also detected bacteria in samples in which the classical method was not successful. Hepatitis A viruses were not detected in mussels, which correlates with the low number of human infections in Slovenia. Infections with noroviruses are more common both worldwide and in Slovenia, so it is not surprising that they were detected in Mediterranean mussels from Slovenian coastal waters.

The most frequently determined genogroup was II.4, sub-genotype 2006b.

The harvesting area at Debeli rtič and non-harvesting area near Piran were the locations most often contaminated with noroviruses. The most heterogeneous sequences of noroviruses were found at Debeli rtič.

We connecting these results with the location of our harvesting areas. The main sea current carries many impurities into this area, there is also dense shipping and the influx of streams and rivers. All this contributes to the contamination of the sea and, consequently, mussels living in this area, with genetically diverse strains of noroviruses.

1 UVOD

Ves severni Jadran in s tem tudi del morja, ki pripada Sloveniji, je zalivskega tipa, zato je ekološko izredno občutljiv in ranljiv. Severna tretjina (del Tržaškega zaliva) je plitva in onesnažena, saj se vanj izlivajo reke Rižana, Dragonja, Badaševica in Drnica, ki s seboj prinašajo komunalne in industrijske odplake, tu se odvija tudi intenziven ladijski promet. Ob tem na morski ekosistem vpliva tudi slaba cirkulacija vodnih mas. Obala slovenskega morja je dolga 46 km in je precej naseljena, kar predstavlja še dodaten obremenilni dejavnik za morsko okolje.

Kljub temu je ta del Jadranskega morja med biotsko najbogatejšimi mediteranskimi območji. V tem predelu najdemo številne živalske vrste, med drugim tudi školjke – tako prosto živeče kot gojene.

Že v zgodnjih zgodovinskih obdobjih so ljudje v svojo vsakodnevno prehrano uvrščali ribe in morske sadeže. Trdimo lahko, da so mehkužci in školjke izredno priljubljena jed tudi v sodobnem času in jih v zadnjih letih uporabljamo tako v preprosti kot v vrhunski kulinariki.

V Sloveniji so školjčišča mediteranskih klapavic (*M. galloprovincialis*) v Strunjanu, Seči in na Debelem rtiču. Na trgu so tudi druge vrste školjk: pokrovače (*Pecten jacobaeus*), ladinke (*Venus verrucosa*), ostrige (*Ostrea edulis*), noetove barke (*Arca noae*) in vongole (*Tapes* spp.).

Školjke se hranijo s precejanjem vode in zaradi takega načina prehranjevanja v svojem telesu kopičijo patogene bakterije, viruse in nekatere toksine. Uživanje surovih školjk je lahko tvegano zaradi možnosti zastrupitev z virusi in bakterijami, zato je kvaliteta morske vode pomemben dejavnik gojenja školjk.

Školjke so pogosto vzrok za izbruhe norovirusnih okužb. V svetu se pojavljajo tudi obolenja zaradi okužb z virusom hepatitisa A. Na Kitajskem je zbolelo kar 300.000 ljudi, kar velja za najbolj množično zastrupitev s hrano, ki jo je povzročil virus (Halliday in sod., 1991).

V državah članicah Evropske skupnosti morajo školjke, ki so v prometu, izpolnjevati pogoje glede prisotnosti morskih biotoksinov, bakterij vrste *Salmonella* spp. in glede dovoljenega števila bakterij *E. coli* (Uredba (ES) št. 2073/2005, Uredba (ES) št. 854/2004).

Glede zagotavljanja varne hrane na trgu je poleg naštetih preiskovanih parametrov zelo pomembno tudi ugotavljanje prisotnosti bakterije *V. parahaemolyticus* in virusov, kot so norovirusi in virus hepatitisa A. Uredba (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila

predvideva določitev meril tudi za te parametre, in sicer ko bodo analitske metode dovolj razvite.

Vsi našteti mikroorganizmi spadajo med povzročitelje črevesnih nalezljivih bolezni. Ob teh v Sloveniji opažamo tudi okužbe s patogenimi sevi *E. coli*. Za bakterijo *E. coli*, ki izloča verotoksin (VTEC), po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni v Evropi najpogosteje obolevajo otroci. Pogostnost tovrstnih obolenj ostaja v zadnjih nekaj letih v Evropi nespremenjena, občasno pa prihaja do množičnih izbruhov, med katerimi so tudi smrtni primeri (ECDC, 2010).

Znano je, da norovirusi povzročijo 90 % vseh nebakterijskih gastroenteritisov in so vzrok številnih izbruhov bolezni, povezanih s hrano (Crowley, 2010). Izvor virusnih obolenj so lahko fekalije, kontaminirana voda ali hrana. Bolezen je zelo nalezljiva, saj se preko obolelega povzročitelja lahko naglo prenaša z običajnimi telesnimi stiki. Epidemiološko zato po načinu prenosa obravnavamo predvsem alimentarne, kontaktne, kapljične in hidrične izbruhe. Za pojav alimentarnih izbruhov so najpogosteje krivi neurejeni izpusti odplak, zaradi katerih onesnaževalci, med katere sodijo tudi virusi, kontaminirajo zajetja pitne vode in morje. V Sloveniji so izpusti fekalnih odplak v občini Piran napeljani v morje s podmorskim izpustom. Tako lahko širjenje fekalno onesnaženih voda vpliva tudi na mikrobiološko kvaliteto školjk, ki jih gojimo v slovenskih školjčiščih.

Ljudje se okužijo s pitjem vode, z uživanjem surove zelenjave in s sadjem, ki je prišlo v stik s kontaminirano vodo, ter z uživanjem školjk, gojenih v kontaminiranih vodah. Zavedati se moramo dejstva, da število prijav tako pri nas kot v drugih državah ni pravi odraz dejanskega stanja. Oboleli zaradi blage klinične slike pogosto ne iščejo medicinske oskrbe ali pa vzrok bolezni ni dokončno diagnosticiran. Za epidemiološko obravnavo oziroma ugotavljanje vzroka obolenja je pri virusu hepatitisa A neugodno tudi dolgo inkubacijsko obdobje.

Problematika školjk, gojenih v naših vodah, do zdaj ni bila v celoti raziskana. Pomembno je ugotoviti razširjenost patogenih bakterij in virusov fekalnega izvora in tako predvideti morebitno potencialno nevarnost za okužbo pri ljudeh.

1.1 NAMEN RAZISKAVE

S študijo smo želeli ugotoviti stopnjo mikrobiološke kontaminacije školjk klapavic (*M. galloprovincialis*). V študiji smo zajeli gojene in prostoživeče školjke, nabrane v slovenskem morju. Pri ugotavljanju bakterijske kontaminacije smo se osredotočili na prisotnost verotoksične bakterije *E. coli* in bakterije *V. parahaemolyticus*, pri ugotavljanju virusne kontaminacije pa na virus hepatitisa A in noroviruse. Z vzorčenjem čez vse koledarsko leto smo želeli zajeti vzorce školjk v vseh letnih časih. Tako so bile školjke izpostavljene različnim temperaturam morske vode in tudi drugim spremljajočim dejavnikom okolja. Z vidika mikrobiološke kontaminacije školjk je bil naš cilj ugotoviti stopnjo kontaminacije v posameznih školjčiščih in ugotoviti morebitne povezave z okužbami pri ljudeh.

1.2 HIPOTEZE

1. V školjkah iz slovenskega morja so prisotne bakterije *E. coli* in *V. parahaemolyticus* ter norovirusi in virus hepatitisa A.

2. Med bakterijami *E. coli*, ki so bakterijski kazalec za ugotavljanje fekalne kontaminacije onesnaženosti morja, so prisotni tudi patogeni sevi (enteropatogeni, enterotoksigeni, enterohemoragični).

3. Bakterije *E. coli*, izolirane iz školjk, so lahko nosilke genov za različne toksine (*stx1, stx2*).

4. Ni povezave med trenutno fekalno onesnaženostjo morja (stopnja kontaminacije školjk z bakterijo *E. coli*) in prisotnostjo patogenih bakterij *V. parahaemolyticus* in virusov.

5. Z verižno reakcijo s polimerazo dokažemo tudi prisotnost tistih sevov *V. parahaemolyticus*, ki jih s klasično mikrobiološko metodo ne ugotovimo.

6. Z molekularnimi metodami pomnoževanja virusnega genoma lahko dokažemo v školjkah tudi virusne povzročitelje črevesnih okužb (noroviruse, virus hepatitisa A).

2 PODATKI IZ LITERATURE

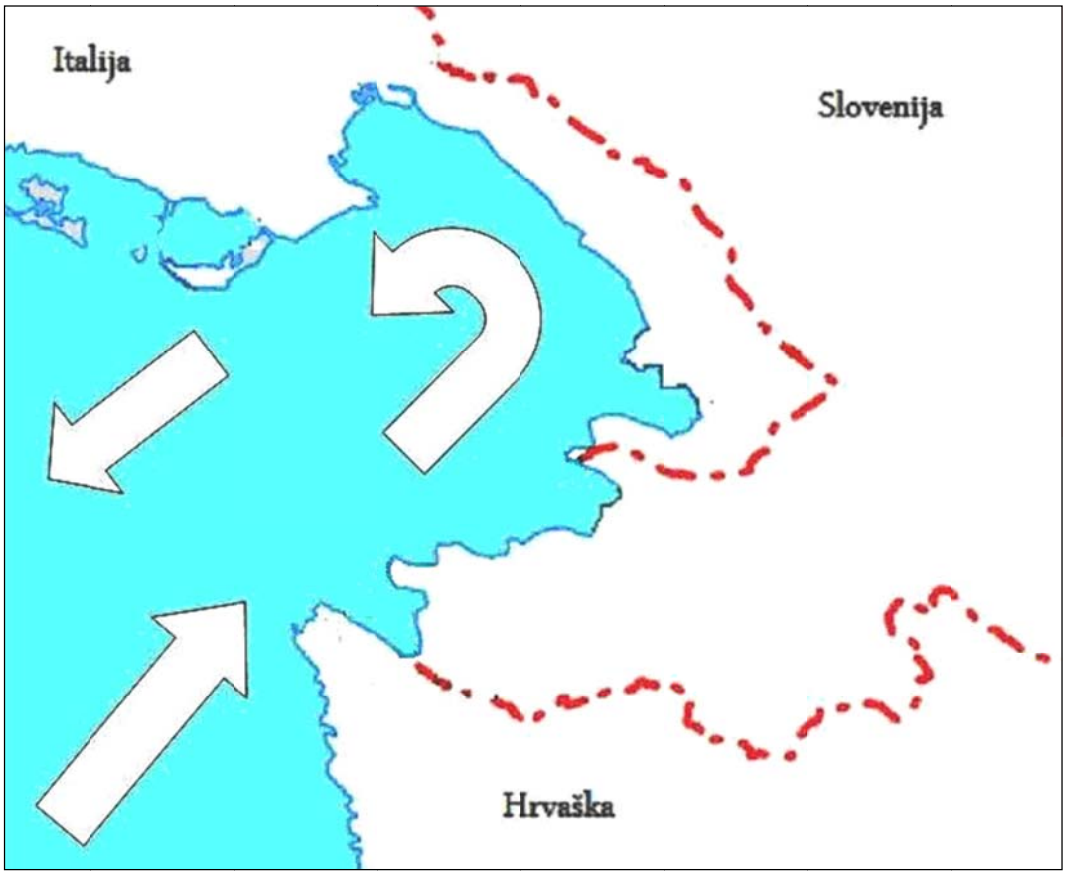
2.1 Severno Jadransko morje

Severni Jadran je razmeroma plitev in s stališča ekologije občutljiv ekosistem, ki ga dodatno obremenjuje vsakoleten razvoj industrije, turizma in pomorskega prometa.

Največja globina morja je v okolici piranske Punte (Rt Madona), tam je morje globoko 37 metrov (Orožen Adamič, 2002). Zaradi razmeroma plitvega morja so večja tudi temperaturna nihanja površinskih slojev. V najglobljih plasteh temperatura ne pade pod 11 °C, zato ga uvrščamo med zmerno topla morja. Zimske temperature se gibljejo med 6 in 12 °C, poleti se segreje do 26 °C (Turk, 2007).

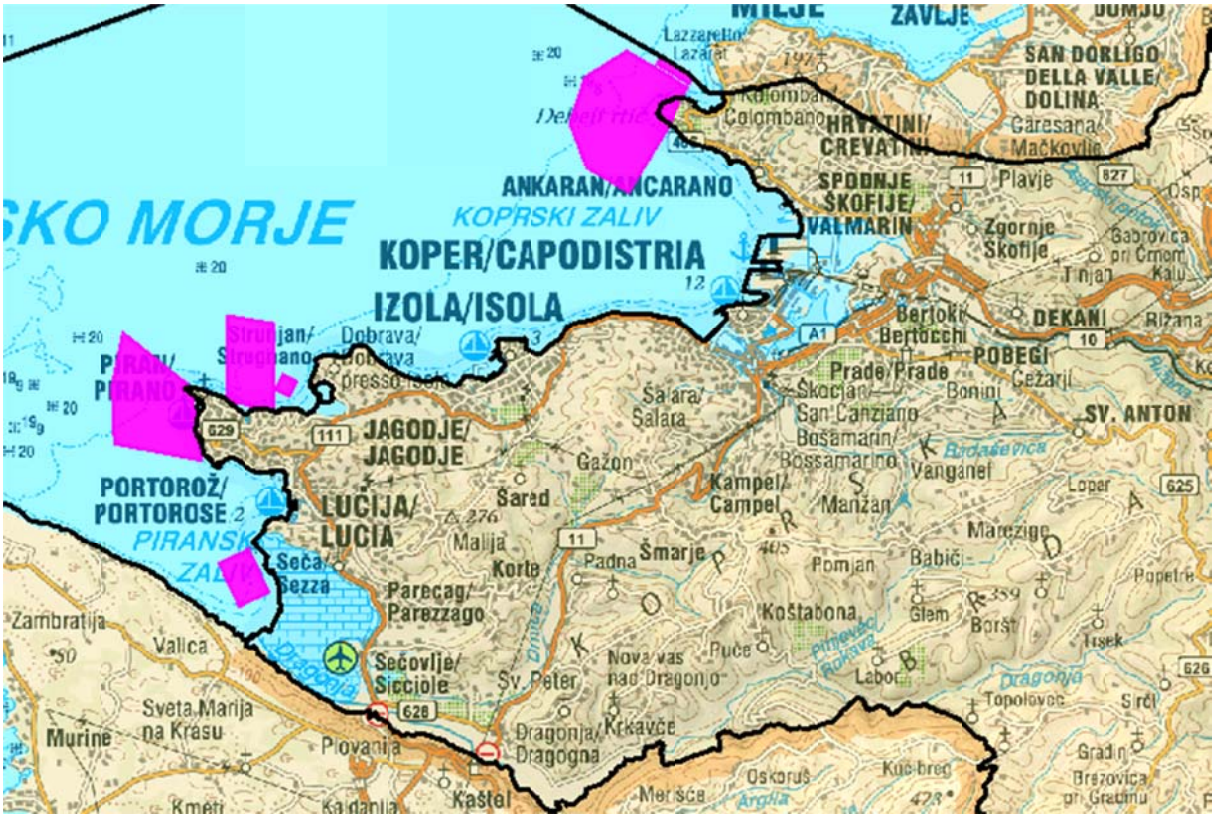
Tudi za slanost morja so značilna nihanja glede na letne čase. Nihanje slanosti je najmočneje izraženo v površinskem sloju; 29, 5–38 ppt (*angl. parts per thousant*), pri dnu se vrednosti gibljejo med 36 in 38 ppt. Slanost je praviloma najvišja pozno poleti, najnižja pa v spomladanskih mesecih.

Zaradi razlik v temperaturi, slanosti in gostoti morske vode, vetrov, bibavice in svobodnih nihanj morske vode nastajajo horizontalni in vertikalni morski tokovi. Jadranski površinski tok je stranska veja glavnega sredozemskega toka. V Tržaški zaliv vstopi ob južni obali iz smeri Istre, se v osrednjem delu meša s površinsko osladkano vodo in zapušča zaliv vzdolž italijanske obale, kar prikazuje slika 1 (Turk, 2007).



Slika 1: Morski tokovi v Tržaškem zalivu. Potek glavnega morskega toka ponazarjajo bele puščice.

Plitvost morja, majhen volumen vode, šibki vodni tokovi, izlivi odpadnih voda, neposredna bližina Luke Koper ter izlivi rek Rižane in Badaševice (slika 2), kamor se stekajo komunalne in tudi nekatere industrijske odplake, predstavljajo velik pritisk na to okolje (Rejec Brancelj, 2003).



Slika 2: Zemljevid obale s prostori za školjčišča, označena so s ciklamno barvo, ter potek rek: Rižane, Badaševice, Dragonje in Drnice. (Povzeto po: Geodetska uprava RS Geopedia)

2.2 Školjke

2.2.1 Gojenje

S kulturo gojenja školjk so v Evropi prvi začeli v Franciji; začetki segajo v leto 1235 (Bardach in sod., 1972).

V Evropi sta gospodarsko pomembni dve vrsti klapavic: užitna (*M. edulis*), ki jo gojijo v Franciji, Veliki Britaniji, na Irskem in Nizozemskem, ter sredozemska (*M. galloprovincialis*) (slika 3).

V Sloveniji je letna proizvodnja klapavic približno 300 ton (Gombač in sod., 2011).

Slika 3: Sredozemska klapavica (*M. galloprovincialis*).

Kultura gojenja mediteranskih klapavic (*M. galloprovincialis*) se je na slovenski obali razvila v treh školjčiščih (slika 2). V Seči in Strunjanu gojijo klapavice že štirideset let, na Debelem rtiču je školjčišče nekoliko mlajše. Po mikrobioloških kriterijih je slovensko morje uvrščeno v kategorijo B, kar pomeni, da morajo vse školjke pred prodajo v postopek prečiščevanja (t. i. depuracije).

Gospodarsko pomembne školjke v Sloveniji so tudi ladinke (*Venus verrucosa*) in jih prosto nabirajo. Količina nabranih ladink je bisteno manjša kot letna proizvodnja klapavic.

Gojenje klapavic v Sloveniji poteka na vrveh (slika 4). Ta način je značilen za pretežni del Sredozemlja. Poleg tega poznamo tudi gojenje školjk na morskem dnu, v plitvih zalivih (Nizozemska in Portugalska), na stebrih (*fr. bouchot*) v Franciji (sliki 5 in 6) ter tudi na mizah. Slednji se običajno uporablja za gojenje ostrig (Gosling, 2003).

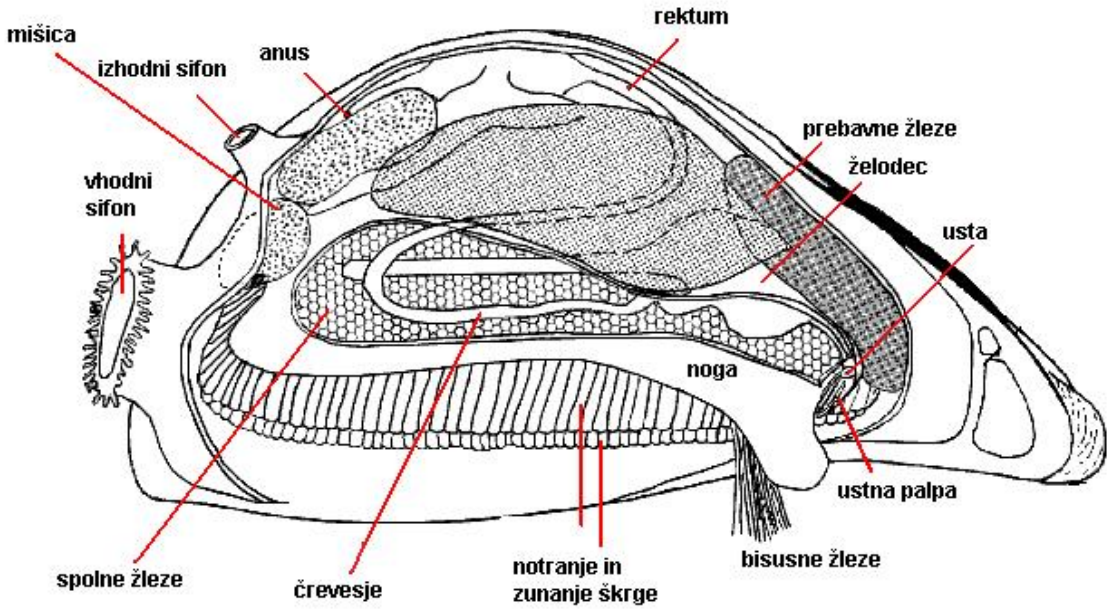
Slika 4: Gojenje klapavic na vrveh v slovenskem morju (avtor A. Bolje, spletna stran Morske biološke postaje: www.mbss.org) .

Sliki 5 in 6: Gojenje klapavic (*fr. bouchot*) v Franciji: mreže s klapavicami so ovite okrog lesenih kolov. Povzeto po: Gosling E. M. Bivalve molluscs 2003 (avtor: P. Goulletquer, IFREMER, Francija).

2.2.2 Klasifikacija, anatomija in fiziologija klapavic

Klapavice spadajo med morske mehkužce iz razreda *Bivalvia*. V Jadranu je avtohtona sredozemska klapavica (*M. galloprovincialis*). Uspevajo na območjih, bogatih s planktonom. Prehranjujejo se z morskimi algami, ki jih zajemajo s precejanjem vode. Poleg hranilnih snovi z vodo zajamejo tudi druge biološke agense, ki jih kopičijo v svojem telesu.

Telo školjk je v grobem sestavljeno iz lupine, plašča, noge, enostavnega srca, ust ter spolnih in prebavnih žlez (Turk, 2007), kar shematsko prikazuje slika 7.



Slika 7: Shema zgradbe klapavice (povzeto po Environmental laboratory, spletna stran http://el.erdc.usace.army.mil/zebra/zmis/zmishelp4/reproduction.htm).

Spolne žleze se aktivirajo v hladnejših mesecih (oktober, november), obdobje razmnoževanja traja do februarja. Spola sta ločena, gonade se razvijejo v plaščnem tkivu. Pri spolno zrelih klapavicah ženskega spola so spolne žleze obarvane oranžno rdečkasto, pri moških osebkih pa kremno bele barve. Štiri do pet ur po oploditvi se jajčece začne deliti in nastane množica celic, razvijejo se tudi migetalke. Kmalu se oblikuje zametek lupine, oblika ličinke pa spominja na obliko jadra in jo imenujemo veliger. To so plavajoče ličinke, ki jih nosijo vodni tokovi. Kasneje se pri njih začne oblikovati tudi noga, tako ličinko imenujemo pediveliger. Te postanejo pretežke, da bi lebdele v vodi, zato se s t. i. bisusnimi nitmi pričvrstijo na podlago (vrvi) (Gosling, 2003).

V obdobju od maja do julija se školjke prestavi v prava školjčišča. Gre za t. i. polja, sestavljena iz 20 vrst, v kateri so sodi, povezanih z dvema vrvema. Na vsaki vrvi je obešenih 20 grozdov, v katerih so klapavice v najlonskih mrežicah (Gombač in sod., 2011). Pri nas klapavice gojijo v globini morja 5–6 metrov. Do konzumne velikosti zrastejo v 12–24 mesecih.

2.3 Mikrobiološko onesnaženje školjk

Školjke s prefiltriranjem morske vode v prebavnih žlezah kopičijo biološke in kemijske onesnaževalce. Tako so v školjkah lahko prisotne patogene bakterije (*Salmonelae* spp., *E. coli*, *Vibrio* spp.), virusi (kalicivirusi, virus hepatitisa A) ali alge bičkarji. S pravilno toplotno obdelavo školjk mikrobe uničimo, ne moremo pa uničiti termostabilnih toksinov.

Znani so številni primeri zastrupitev s školjkami. Okužbe so pogostejše v deželah, kjer je uživanje morske hrane bolj razširjeno (Japonska, Kitajska, Tajska, Koreja, ZDA, Francija), in pri uživanju surovih školjk (Okuda in sod., 1997; DePaola in sod., 2000, DePaola in sod., 2003; Le Guyader in sod., 2006; Pommepuy in sod., 2006; Harth in sod., 2009; Sala in sod., 2009;).

Školjke, ki jih prosto nabiramo, so pogosteje kontaminirane z enteričnimi virusi kot tiste iz školjčišč. Razmerje, ki so ga opisali španski in francoski raziskovalci, med njimi je 70,6 % : 58,3 %. Poleg tega so prosto nabrane školjke tudi pogosteje kontaminirane z različnimi virusi (Vilariño in sod., 2009). Bakterije *E. coli* so prav tako lahko prisotne v školjkah, ob obali Francije so dokazali tudi seve, ki proizvajajo toksine (Gourmelon in sod., 2006).

Tudi hranjenje živila na primerni temperaturi, termična obdelava in higiena je poglavitnega pomena pri pripravi hrane brez mikrobioloških tveganj.

Zdravstveno tveganje je tako povezano predvsem s tradicionalnim načinom priprave, ki ne predvideva zadostne termične obdelave živila. Analiza kritičnih kontrolnih točk, HACCP (*angl. Hazard Analysis of Critical Control Point*), v postopku priprave hrane zajema tudi spremljanje kakovosti vode v školjčiščih, ustrezno skladiščenje, morebitno prečiščevanje, t. i. postopek depuracije in termično obdelavo, kjer je to izvedljivo (Rees in sod.,2010).

Predpisi glede varnosti mikrobioloških kriterijev školjk za uživanje (Uredba ES št. 853/2004, ES št. 854/2004 in ES št. 1021/2008) se nanašajo le na bakteriološko kontaminacijo školjk, to je število *E. coli*, ki so pokazatelj fekalnega onesnaženja. Številne študije pa dokazujejo, da so školjke pogosto kontaminirane tudi z virusi (Lees, 2000; Muniain-Mujika in sod., 2003).

2.4 Bakterija *V. parahaemolyticus*

2.4.1 Odkritje in poimenovanje

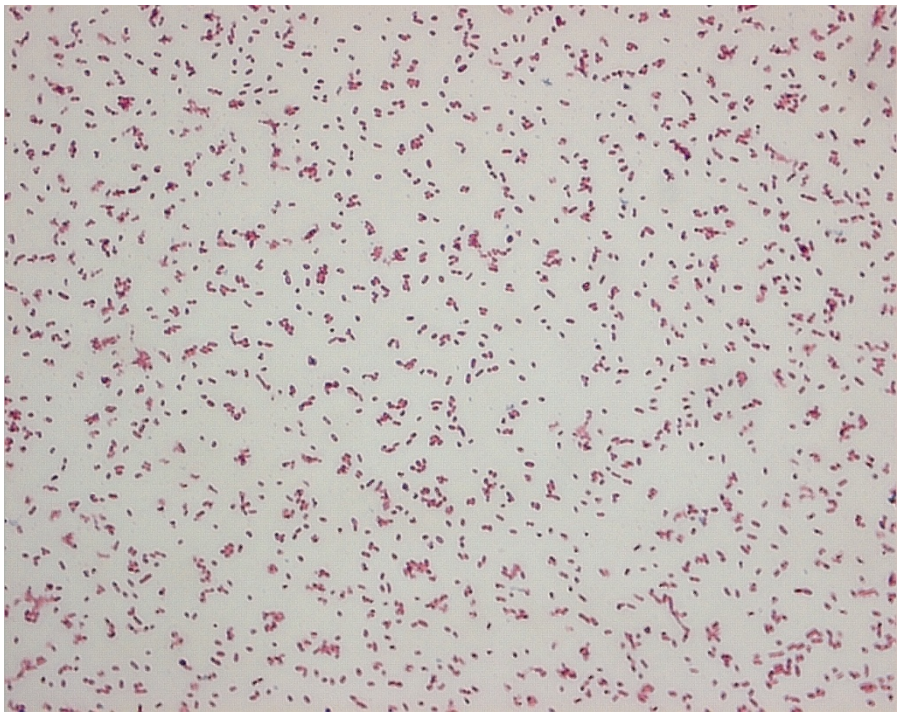
Izraz *Vibrio* se je prvič pojavil leta 1854, ko je italijanski znanstvenik Filippo Pacini v črevesju žrtev kolere odkril paličast bacil. Šele 30 let kasneje je Robert Koch »ponovno odkril« istega povzročitelja (Bentivoglio in Pacini, 1995).

V. parahaemolyticus so prvič izolirali na Japonskem iz črevesne vsebine človeka, ki se je zastrupil s hrano, imenovano »shirasu« (rahlo sušene sardine). Prvi je o tem poročal japonski znanstvenik Fujino leta 1951 (Fujino, 1951).

2.4.2 Morfologija in fiziologija bakterijske celice

Bakterijo *V. parahaemolyticus* uvrščamo v rod *Vibrio* in družino *Vibrionaceae*.

Bakterija je po Gramu negativna, nesporogena, ravna ali rahlo ukrivljena palička (slika 8). Ima polarni biček in je v tekočih medijih gibljiva (Baumann in Schubert, 1984).



Slika 8: Mikroskopski preparat bakterije *V. parahaemolyticus*, pobarvan po Gramu. Slikano pri 1000-kratni povečavi. Vir: I. Gruntar, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta UL.

Genom bakterije *V. parahaemolyticus* sestavljata dva krožna kromosoma: večji s 3.288.558 in manjši s 1.877.212 bp. Na večjem kromosomu so geni, ki so pomembni za rast bakterije, in geni za ribosomalne proteine, na manjšem geni za prilagajanje bakterije na spremembe okolja (Makino in sod., 2003).

Bakterijo *V. parahaemolyticus* razvrščamo na podlagi somatskih O in kapsularnih K antigenov; flagelarni H antigeni so pri vseh sevih identični. Tako lahko dobimo množico kombinacij serovarov O:K (Sakazaki, 1992).

Izolacija bakterijskih kolonij *V. parahaemolyticus* s klasičnimi gojišči je pri temperaturah morja, nižjih od 15 ^{o}C, težavna. Predvideva se, da takrat preide v t. i. stanje VBNC (*angl. viable but nonculturable*) (Jiang in Chai, 1996). Podoben pojav opisujejo tudi pri nekaterih drugih bakterijah, kar je predmet številnih raziskav. Najverjetneje gre za obrambno reakcijo bakterije na neugodne vplive okolja, kot so pomanjkanje hranil, nizke temperature in delovanje UV-žarkov. Biokemične spremembe v celici pripomorejo k preživetju mikroba (Oliver, 2000).

2.4.3 Razširjenost

Bakterija *V. parahaemolyticus* je del običajne morske mikroflore. Je halotoleranten, saj je potreba po natriju za bakterije iz rodu *Vibrio* vitalnega pomena (Reichelt in Baumann, 1974). Mikrob naseljuje morska področja od razmeroma toplih geografskih področjih Evrope in ZDA (DePaola in sod., 2000; DePaola in sod., 2003) do južnega dela Čila (Fuenzalida in sod., 2006) in Aljaske (McLaughlin in sod., 2005).

2.4.4 Patogenost in virulenčni dejavniki

Leta 1968 je japonski znanstvenik Wagatsuma za dokazovanje hemolitične aktivnosti bakterije *V. parahaemolyticus* razvil agar, ki je vseboval 7 % NaCl, defibrinirano kri in D-manitol kot vir ogljikovih hidratov. Hemolizo, ki je nastala ob rasti na agarju, je poimenoval pojav Kanagawa (*angl. Kanagawa phenomenon*) (Wagatsuma, 1968) in je pokazatelj patogenosti bakterije. Nastane zaradi hemolitične aktivnosti hemolizina, pogosteje jo opazimo pri kliničnih sevih. Pri sevih, ki so izolirani iz okolja, je le pri 1–2 % izražen zapis za hemolitični protein, zato pri njih le redko opazimo pojav Kanagawa (Miyamoto in sod., 1969).

S študijami na prostovoljcih so ugotovili, da mikrob po zaužitju sevov v koncentraciji 2 x 10^5–3 x 10^7 CFU/g, ki imajo hemolitično aktivnost, povzroči gastroenteritis, medtem ko zaužitje sevov brez hemolitične aktivnosti v še višjih koncentracijah (1,6 x 10^{10} CFU/g) ne povzroča diareje (Sanyal in Sen, 1974; Oliver in Kaper, 1997).

Patogenost bakterije *V. parahaemolyticus* povezujejo z dvema proteinoma, ki sta po svoji funkciji hemolizina: TDH (*angl. thermostable direct hemolysin*) in TRH (*angl. thermostable related* (Shirai in sod., 1990; Nishibuchi in Kaper, 1995). Bakterija ima lahko enega ali oba gena, lahko pa je brez njih (Johnson in sod., 2009).

Poimenovanje teh virulenčnih dejavnikov izhaja iz njihovih lastnosti, tj. odpornosti na visoko temperaturo, neposrednem (direktnemu) vplivu na eritrocite in hemolize. Protein TDH je odporen na 10-minutno segrevanje pri 100 ºC, torej je termostabilen. Hemolitični učinek proteina so potrdili tako, da se kljub dodajanju lecitina, hemoliza na eritrocitih ni povečevala, tako so sklepali na neposredno (direktno) delovanje na eritrocite. Hemolitično aktivnost proteina so ugotovili z agarskim precipitacijskim testom in nastankom precipitacijske linije, ki je reagirala z antihemolitičnim antiserumom (Sakurai in sod., 1973).

Segrevanje pri temperaturi 50–60 ºC hemolizin inaktivira, pri temperaturi, višji od 90 ºC, pa ne. Pojav, ki je podoben kot pri alfa stafilokoknem enterotoksinu, imenujemo »efekt Arrhenius« (Arbuthnott, 1970).

Pri ekstrakciji hemolizina je s posebnim postopkom osamljen še protein (faktor inaktiviranja), ki čisti hemolizin inaktivira. Ta protein deluje pri temperaturi 50−60 ºC, pri temperaturi, višji od 70 ºC, pa izgubi svojo aktivnost. S segrevanjem na 50–60 ºC sta faktor inaktiviranja in hemolizin združena, torej hemolizin ne more delovati. Ko s temperaturo 80−100 ºC uničimo njegov faktor inaktiviranja, ostane hemolizin zopet prost in aktiven (Takeda in sod., 1974).

– Termostabilen direktni hemolizin (TDH)

Patogenost bakterije *V. parahaemolyticus* povezujejo s hemolizinom TDH, ki povzroča beta hemolizo na agarju Wagatsuma (Miyamoto in sod., 1969). Je protein z molekulsko maso 46 kDa (Honda in Lida, 1993). TDH lizira človeške eritrocite v dveh stopnjah; najprej se pritrdi na eritrocite, zaradi zvišanja nivoja izločanja Cl^- in vdora ionov Ca^{++} v celico posledično poviša koncentracijo kalcijevih ionov in fosforilacijo proteina kinaze C (Takahashi in sod., 2000).

Poleg hemolitičnih mu pripisujejo tudi enterotoksične, kardiotoksične in citotoksične aktivnosti (Honda in Lida 1993; Nishibuchi in sod., 1992).

Zapis gena TDH je na kromosomu, KP pozitivni sevi imajo po dve kopiji gena *tdh,* in sicer *tdh1* in *tdh2*, ki sta si sorodna v 97 % genetskega zapisa (Nishibuchi in Kaper 1990).
Več kot 90 odstotkov sevov *V. parahaemolyticus*, izoliranih iz kliničnih primerov, in manj kot 1 odstotek sevov, izoliranih iz hrane ali okolja, ima izražen gen *tdh* (Honda in sod., 1988; DePaola in sod., 1990; Miyamoto in sod., 1969).

– Termostabilnemu hemolizinu soroden hemolizin (TRH)

Imunološke in biokemijske lastnosti TRH so zelo podobne tistim, ki jih ima TDH. TRH kodirata dve genski kopiji – *trh1* in *trh2*, ki ležita na kromosomu in sta si sorodni v 84 % sekvenc (Kishishita in sod., 1992).
V obdobju po letu 1988 so ugotovili, da so sevi *V. parahaemolyticus*, ki so imeli zapis za *trh,* proizvajali encim ureazo (Okuda in sod., 1997), kar sicer ni njegova običajna lastnost. Gre za genetsko povezavo med strukturnim genom za ureazo (*ureC*) in gena *trh* na kromosomu virulentnih sevov (Iida in sod., 1997).

– Drugi virulenčni dejavniki

Sevi bakterije *V. parahaemolyticus*, ki ne proizvajajo toksinov, lahko invadirajo črevesne celice epitelija tudi na drugačne načine. Tak primer je encim serinska proteaza (proteinaza A), ki po parenteralni aplikaciji miškam povzroča krvavitve v tkivih in tudi pogin (Lee in sod., 2002).
Virulenčni dejavniki so tudi geni tipa III sekrecijskega sistema (TTSS). Te imajo tudi druge po gramu negativne bakterije, ki povzročajo drisko (šigele, salmonele, enteropatogene *E. coli*) (Makino in sod., 2003). Preko TTSS se v celice prenašajo različni proteini, ki poškodujejo zgradbo epitelijskih celic črevesja (Hueck, 1998).
Pri bakteriji *V. parahaemolyticus* se zapis za TTSS pojavlja v dveh skupinah na kromosomih; TTSS1 je na večjem, TTSS2 pa na manjšem kromosomu (Makino in sod., 2003). Oba naj bi s sinergističnim delovanjem prispevala k patogenezi mikroba (Ono in sod., 2006).

2.4.5 Ugotavljanje bakterije *V. parahaemolyticus*

– Gojiščna bakteriološka preiskava

Konvencionalna metoda za rutinsko analizo vzorcev vključuje uporabo dveh obogatitvenih gojišč, temu sledi izolacija kulture na dveh različnih trdnih gojiščih.

Postopek izolacije temelji na obogatitvenem tekočem gojišču − bazični peptonski vodi APW (*angl. alkaline peptone water*). Zaradi alkalnega pH (8,5 ± 0,1) in visoke vsebnosti NaCl gojišče vibrijem omogoča optimalno rast in zavira rast ostalih bakterij. Gojišču se doda tudi 1–2 % peptona in s tem ustvarja optimalni medij za vibrije, ki izvirajo iz morskega ekosistema.

Drugo pomembno gojišče je »marine« agar, ki ga je razvil Zobell (Zobell, 1941). Uporablja se predvsem za izolacijo vibrijev iz okoljskih vzorcev. Pomanjkljivost agarja je, da je neselektiven in omogoča rast ne samo vibrijem, ampak tudi drugim bakterijam.

Najbolj razširjeno gojišče − TCBS (*angl. thiosulfate citrate bile salt sucrose*) agar, se uporablja za izolacijo iz kliničnih in okoljskih vzorcev kot tudi iz kontaminirane hrane (Gomez-Gil in Roque, 2006).

Prvi standardni postopek, ki je priporočal postopke za dokazovanje *V. parahaemolyticus,* je bil ISO 8914:1990, ki ga je leta 2007 nasledil ISO/TS 21872-1. Metodi se med seboj razlikujeta v izbiri drugega trdnega gojišča. Poleg agarja TCBS je bil sprva predpisan TSAT (*angl. triphenyltetrazolium chloride soya tryptone agar*), v ISO standardu 21872-1 je drug agar izborno kromogeno gojišče po izboru laboratorija.

– Molekularno potrjevanje

Za identifikacijo bakterije *V. parahaemolyticus* uporabljamo več možnih tarč v njenem genomu (imenujemo jih tudi vrstno specifični markerji). To so:

- sekvenca regulatornega gena *toxR* (Kim in sod., 1999),
- gen *tlh*, ki kodira termolabilni hemolizin (Bej in sod., 1999),
- pR72H odsek DNA na kromosomu (Lee in sod., 1995),
- gen *gyrB*, ki kodira podenoto B encima giraze DNA (Venkateswaran in sod., 1998),
- gen *vpm*, ki kodira metaloproteazo (Luan in sod., 2007).

Najpogosteje ugotavljamo dve tarčni molekuli: gena *toxR* in *tlh*.

Regulatorni gen *toxR so* najprej odkrili na operonu *V. cholerae,* nekoliko kasneje pa tudi pri *V. parahaemolyticus* in tudi pri njem potrdili regulatorno funkcijo (Lin in sod., 1993). Stopnja sorodnosti je pri *toxR* veliko manjša, kot pri rRNA (Lin in sod., 1993; Kita-Tsukamoto in sod., 1993).

Gen *tlh*, ki kodira za termolabilni hemolizin (TLH), ni virulenčni faktor, temveč marker za vrstno specifično ugotavljanje bakterije *V. parahaemolyticus* (Taniguchi in sod., 1986).

2.4.6 Klinične oblike obolenj

Bakterija *V. parahaemolyticus* povzroča tri oblike obolenj:

- gastroenteritis z vodeno ali krvavo drisko, z bruhanjem, trebušnimi krči, glavobolom, visoko telesno temperaturo, slabostjo in mrazenjem (Daniels in sod., 2000b; Morris in Black, 1985); ta oblika je najpogostejša,
- septikemijo; ki se pojavlja redkeje, v večini primerov je povezana s predhodnimi obolenji jeter (Hlady in Klontz, 1996),
- infekcija ran se pojavi le izjemoma, ko le-te pridejo v stik z morsko vodo, v kateri se nahaja *V. parahaemolyticus* (Tacket in sod., 1982).

Iz rodu *Vibrio* sta poleg *V. parahaemolyticus* za ljudi pomembna patogena predstavnika še *V. cholerae* in *V. vulnificus*. Vsi so povzročitelji zastrupitev, povezanih s hrano in vodo.

Bakteriji *V. parahaemolyticus* in *V. cholerae* povzročata drisko, vendar je njun način delovanja različen. Bakterija *V. parahaemolyticus* je enteroinvazivna, naseljuje in povzroča vnetje tankega črevesja (Chaterjee in sod., 1984). Za patogeno delovanje *V. cholerae* so odgovorni toksini (Herrington in sod., 1988).

Sevi *V. parahaemolyticus* niso patogeni samo za ljudi, temveč tudi za nekatere rake. Na farmah kozic (*Penaeus orientalis*) imajo zaradi mikroba velike gospodarske škode. Povzroča t. i. bolezen rdečih nog. Zaradi virulenčnih dejavnikov, predvsem encimov, se na rakcih pojavlja značilno rdeče obarvanje okončin, rakci pa v velikem številu poginjajo (Sudheesh in Xu, 2001).

2.4.7 Epidemiologija

Temperatura morja je pomemben dejavnik, ki vpliva na rast bakterije *V. parahaemolyticus* (Kaneko in Colwell, 1975), kar potrjujejo tudi številne okužbe v poletnih mesecih. V tropskih deželah je sezonsko pojavljanje manj izraženo (Sarkar in sod., 1985).

Od odkritja leta 1951 pa do leta 1996 je bakterija *V. parahaemolyticus* povzročala okužbe v posamičnih primerih, povzročitelji so bili na geografsko različnih področjih serološko različni vibriji. Februarja 1996 so potrdili prve primere obolelih za pandemskim sevom O3:K6 v Indoneziji. Ta sev je imel le gen *tdh* in ni izločal encima ureaze (Okuda in sod., 1997). Pred tem obdobjem so na Japonskem identificirali seve *V. parahaemolyticus* s podobnim genetskim vzorcem kot O3:K6, le da niso imeli zapisa za gen *tdh*. Na podlagi tega sklepamo, da O3:K6 izvira iz nepatogenih sevov, ki so pridobili gen *tdh*, njihovo izvorno mesto pa naj bi bila Japonska (Okura in sod., 2003).

Na Japonskem je po poročilih japonskega ministrstva za zdravje v obdobju 1987–1996 *V. parahaemolyticus* povzročil kar 75 % vseh alimentarnih bakterijskih okužb, medtem ko o povečani incidenci s sevom O3:K6 poročajo v letih 1997 in 1998 (IDSC).

Pandemski sev se je nato razširil leta 1998 v ZDA (Daniels in sod., 2000a) in v Čile (Gonzalez-Escalona in sod., 2005), pojavili so se tudi številni drugi sevi (Chowdhury in sod., 2000).

O pandemskem sevu O3:K6 so v Evropi prvič poročali leta 2004 v Španiji (Martinez-Urtaza in sod., 2005) in tudi Franciji (Quilici in sod., 2005).

Ljudje se najpogosteje okužijo s surovo, slabo toplotno obdelano ali naknadno kontaminirano morsko hrano (rakci, jastogi, rakovice, razne vrste školjk, ribe). Okužbe preko ran, inficiranih s kontaminirano vodo, so redke (Tacket in sod., 1982).

V Indiji, kjer je incidenca zelo velika, so ugotovili, da *V. parahaemolyticus* prenašajo različne vrste muh (Chatterjee in sod., 1978).

2.4.8 Zakonodaja

Trenutno v Evropski uniji še nimamo obveznih predpisov za testiranje školjk na bakterijo *V. parahaemolyticus*. Uredba (ES) št. 2073/2005, ki določa tudi mikrobiološke kriterije za živila, predvideva tudi, da je za nekatera mikrobiološka tveganja − mednje vključuje tudi prisotnost vibrijev in virusov − treba razviti zanesljive metode za njihovo ugotavljanje.

2.5 Verotoksična *E. coli*

2.5.1 Odkritje in poimenovanje

Bakterijo *E. coli* je leta 1884 odkril nemški pediater Teodor Escherich (Escherich, 1885). Pripada družini *Enterobacteriaceae* in rodu *Escherichia* (Madigan, 2003). *E. coli* je del normalne črevesne mikroflore, najdemo jo tudi v vodi in zemlji (Madigan in sod., 2003).

Nekateri sevi izdelujejo toksine, ki zavirajo celično sintezo proteinov. Zaradi učinka toksinov na celično linijo celic Vero jih imenujemo verotoksini (VT), zaradi delovanja podobnega toksinom bakterije *Shigella dysenteriae* tudi šigovi toksini (Stx). Bakterijske seve, ki te toksine izdelujejo, imenujemo verotoksin proizvajajoča, verotoksigena ali verotoksična *E. coli* − VTEC (*angl. verotoxic E. coli*) ali šigov toksin proizvajajoča *E. coli* − STEC (*angl. shiga toxin producing E. coli*) (Melton-Chelsea in sod., 1998).

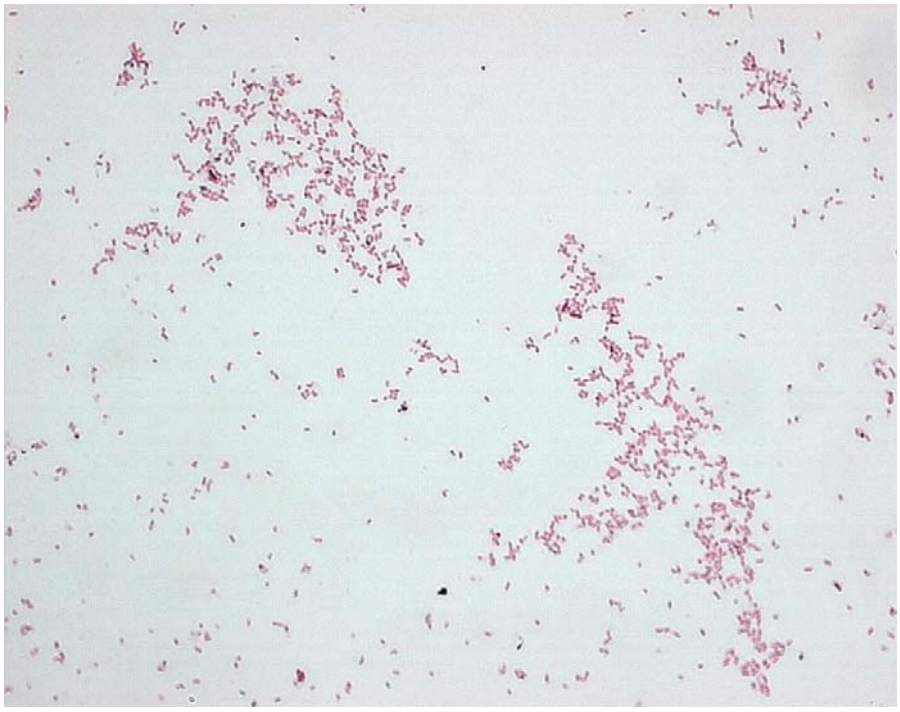
V skupino verotoksigenih uvrščamo tudi enterohemoragične *E. coli* − EHEC (*angl. enterohemorrhagic E. coli*) (Kaper in sod., 2004), ki so povezane s hemoragičnim kolitisom in hemolitičnim uremičnim sindromom pri ljudeh. Ta izraz se je uveljavil predvsem med zdravniki po Evropi. Seve, ki so povzročili bolezni pri ljudeh, pa so označevali kot HP-VTEC (*angl. human pathogenic* VTEC). Med najbolj preučevanimi sevi *E. coli* je sev O157:H7, ki naj bi povzročal največji delež vseh okužb EHEC. Za druge enterohemoragične seve je težje določiti delež incidence, saj se jih v preteklosti pogosto ni ugotavljalo (Nataro in Kaper 1998, Mathusa in sod., 2010). Vse več infekcij je opaziti tudi z nekaterimi drugimi sevi: O111, O145, O91, O26 in O103 (Mathusa in sod., 2010).

2.5.2 Morfologija

E. coli je po Gramu negativna, paličasta (slika 9) fakultativno anaerobna in večinoma gibljiva bakterija. Poleg peritrihnih bičkov, ki bakterijam omogočajo gibanje, se iz celične stene iztezajo še fimbriji in pili. Fimbriji pomagajo bakteriji pričvrstiti se na celico gostitelja. Ima somatske (antigeni O), kapsularne (antigeni K), fimbrijske (antigeni F) in flagelarne (antigeni H) antigene. Na podlagi somatskih antigenov O, ki so po sestavi lipopolisaharidi na zunanji membrani bakterij, ter antigenov H (antigeni bičkov) jih delimo na različne serotipe (Edwards in Ewing, 1972). Veliko je serološko navzkrižnih reakcij med različnimi antigeni O serotipov *E. coli* in tudi reakcij med antigeni O drugih vrst bakterij (*Citrobacter, Salmonella, Shigella, Yersinia*). Do navzkrižnih reakcij prihaja zaradi podobnosti ali enakosti v njihovi kemijski

zgradbi. Antigeni H so vezani na flageline, ki so po kemijski sestavi beljakovine in so del flagelarne strukture. Gibljivost bakterij je vezana na prisotnost antigena H.

Bakterije *E. coli* so oksidaza-negativne, fermentirajo glukozo ter druge ogljikove hidrate, pri čemer nastanejo kisline in plin. So citrat-negativne bakterije, ki ne izdelujejo H_2S, ne hidrolizirajo uree in želatine, nimajo encima lipaze, večina sevov pa ima encim β–glukoronidazo. Nekateri neznačilni sevi ne razgrajujejo laktoze, lahko so negibljivi, rastejo v anaerobnih razmerah oziroma nimajo encima β–glukoronidaze (Bergey in Holt, 1994). Med *E. coli*, ki jih uvrščamo v skupino verotoksičnih, še posebno za *E. coli* O157 velja, da za razliko od večine sevov *E. coli* ne raste pri temperaturi 44,5 °C, ne fermentira sorbitola (March in Ratnam, 1986) in ne izdeluje β–glukoronidaze in so bolj tolerantni za kislo okolje. Tudi znotraj te skupine obstajajo izjeme s posebnimi biokemijskimi lastnostmi (Karch in Bielaszewska, 2001).



Slika 9: Mikroskopski preparat bakterije *E. coli*, pobarvan po Gramu. Slikano pri 1000-kratni povečavi. Vir: I. Gruntar, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta UL.

2.5.3 Razširjenost

Najpomembnejši rezervoar verotoksigene bakterije *E. coli* je govedo (Bettelheim, 2001; Kuhnert in sod., 2005; Gyles, 2006), prisotna je tudi pri prašičih, drobnici, psih, piščancih in pticah ter nekaterih insektih (Nataro in Kaper 1998; Garcia in sod., 2010; Beutin in sod., 1993; Bouvet in sod., 2001). Tudi raziskava Breznikove v Sloveniji je pokazala, da so tovrstne bakterije prisotne pri 20,4 % govedi. Dokazali so jih iz rektalnih brisov govedi, v 0,8 % pa je bil prisoten tudi serotip O157 (Breznik, 1997). Primarno mesto, kamor se bakterije naselijo, je kolon, natančneje zadnjih nekaj centimetrov pred rektumom (Low in sod., 2005). Večinoma živali za diarealno boleznijo ne zbolijo in predstavljajo le rezervoar (Beutin in sod., 1993).

Seve *E. coli* iz skupine VTEC so najpogosteje izolirali iz surovega govejega mesa, surovega mleka, mesa drugih živalskih vrst, zelenjave ter tudi iz rib in vode (Mathusa in sod., 2010). O prisotnosti VTEC v školjkah poročajo tudi iz Maroka (Bennani in sod. 2011) in ZDA (Samadpour in sod., 1994).

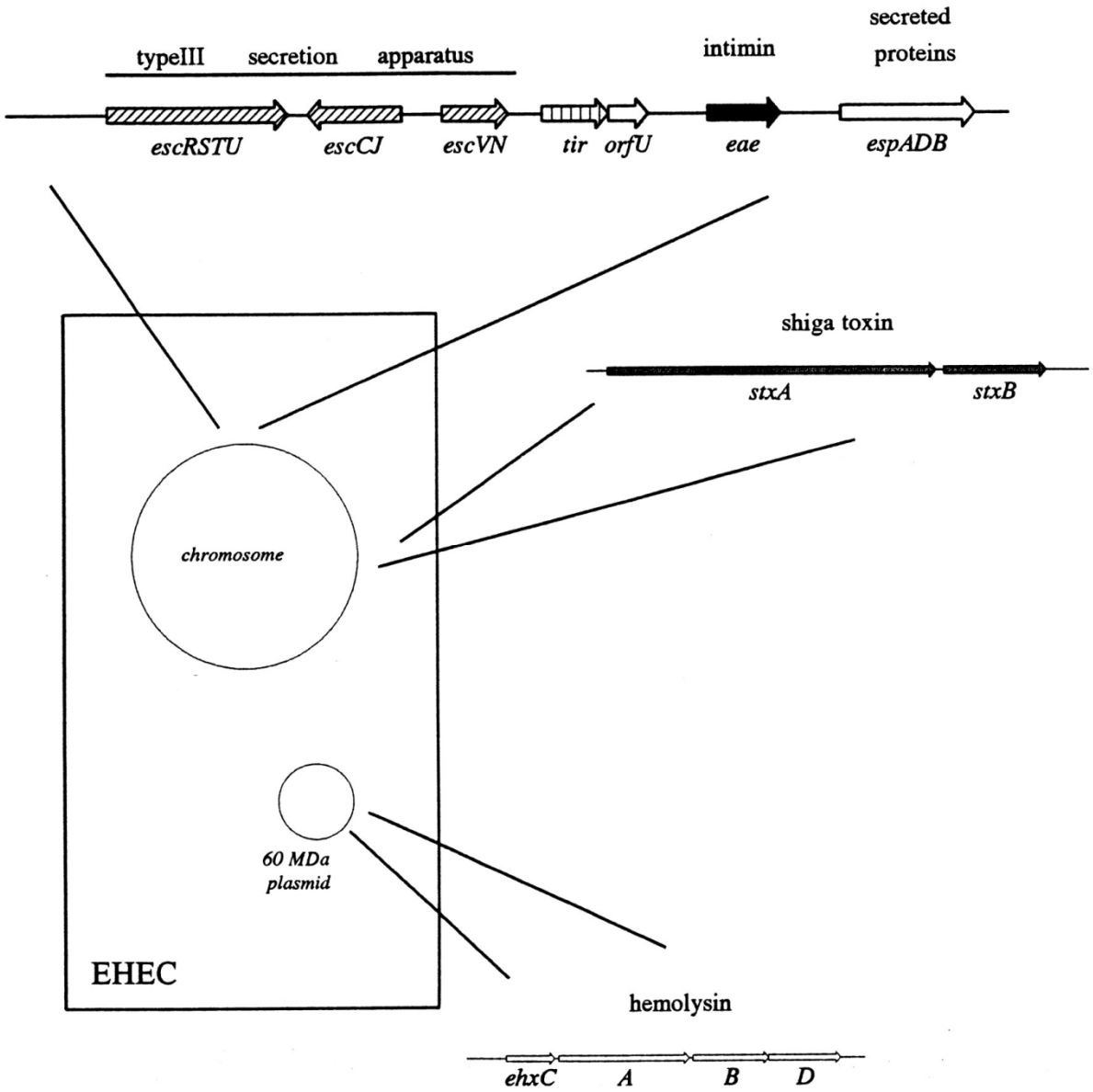
2.5.4 Patogenost in virulenčni dejavniki

Na podlagi virulenčnih dejavnikov, proizvodnje toksinov in adhezije razdelimo seve *E. coli* v več skupin: pritrditvene in prepisovalske − AEEC (*angl. attaching and effacing E. coli*), enteropatogene − EPEC (*angl. enteropathogenic E. coli*), enteroinvazivne − EIEC (*angl. enteroinvasive E. coli*), enterotoksigene − ETEC (*angl. enterotoxigenic E. coli*), enteroagregativne − EaggEC (*angl. enteroaggregative E. coli*), difuzno adherentne − DAEC (*angl. diffuse-adhering E. coli*) ter *E. coli*, ki izdelujejo verocitotoksine − VTEC (*angl. verotoxin-producing E. coli*) (Nataro in Kaper, 1998).

Predvidevajo, da so šigovi toksini (Stx) najpomembnejši virulenčni dejavniki bakterije VTEC. Gre za skupino toksinov, ki so si v zgradbi in načinu delovanja zelo podobni. Prva je skupina Vtx1 in je podobna toksinu *S. dysenteriae* tipa 1, druga je skupina Vtx2, ki se s predhodno ujema v manj kot 60 % aminokislinskega zaporedja. Genetski zapis za Vtx1 in Vtx2 je najverjetneje posledica vrinjenega bakteriofaga v kromosom bakterije (Melton-Chelsea in sod., 1998). Zgradba toksinov skupine Vtx1 je bolj homogena, v skupini Vtx2 pa avtorji navajajo različice toksinov, ki se med seboj razlikujejo tako antigensko kot po bioloških

lastnostih, večkrat jih tudi povezujejo z resnejšimi bolezenskimi zapleti (Boerlin in sod., 1999).

Šigovi toksini so po svoji zgradbi polipeptidi, sestavljeni so iz podenote A in petih podenot B. S podenoto B se toksin pričvrsti na specifične receptorje tarčnih celic, podenota A pa z endocitozo vstopi v njihovo citoplazmo. Pri pričvrstitvi na endotelne celice sodeluje tudi protein intimin (kodira ga gen *eae*). Podenota A je encimsko aktivna in ovira sintezo celičnih beljakovin ter tako povzroča poškodbe in propad endotelnih celic v ledvicah, možganih, črevesju, celic Vero oziroma vseh celic, ki imajo ustrezne receptorje (Nataro in Kaper, 1998). Pri bolnikih, pri katerih ugotovijo verotoksigene seve z geni *vtx2* in *eae* (slika 10), je večja možnost, da bodo zboleli za hemolitično uremičnim sindromom (Mathusa in sod. 2010; Erickson in Doyle, 2007; Bugarel in sod., 2011).



Slika 10: Shematski prikaz genov EHEC. Zanje so značilni geni *stx*, ki se nahajajo na kromosomu, ter plazmid 60-MDa, ki kodira enterohemolizin *ehx* in tudi fimbrijske antigene. Povzeto po: Nataro in Kaper, 1998.

Kot možni dejavnik patogenosti VTEC je opisan tudi α-hemolizin oziroma gen *ehx*A (slika 10), ki ga kodira. Način patogenega delovanja v primerih hemoragičnih kolitisov oziroma HUS še ni pojasnjen (Taylor, 2008).

Poleg toksinov, ki so toksični za celice gostiteljev, so virulenčni dejavniki še: kapsula, ki ščiti bakterijo pred gostiteljevim imunskim odzivom, sistemi za prevzem železa, t. i. sideroforji, ter

fimbrijski in nefimbrijski adhezini, ki bakteriji omogočajo vezavo na gostiteljske epitelijske celice in s tem kolonizacijo (Salyers in sod., 1994).

2.5.5 Klinična slika in vir okužbe

Večina sevov *E. coli* je nepatogenih. Patogeni sevi pa povzročajo okužbe prebavil, sečil, meningitis in tudi sepso pri bolnišničnih bolnikih, vnetje slepiča, žolčnika, okužbe rodil ter pljučnice (Andlovic, 2002).

Simptomi zastrupitve so navadno blagi, redkeje se pojavijo hude oblike, kot je gastroenteritis in hemoragični kolitis. Zaradi hemolitično uremičnega sindroma ali trombotične trombocitopenične purpure bolnik lahko umre. Infekcije so posebej nevarne pri starejših, imunsko oslabljenih in otrocih.

Glavni vir okužb pri ljudeh je z govejim mesom, mlekom, s kontaminirano vodo ali neposrednim stikom z živaljo ali obolelimi ljudmi (Griffin in sod., 1995, Mathusa in sod., 2010). Z iztrebki izločajo domače živali številne bakterije, opisani so primeri, ko so se ljudje okužili od ovc, ki so v gramu iztrebkov vsebovale tudi 10^6 bakterij (Strachan in sod., 2001). Španski raziskovalci so presenetljivo ugotovili višji delež verotoksigenih *E. coli* pri zdravih živalih kot pri živalih z diarejo (Orden in sod., 2003).

Avtorji opisujejo, da je za okužbo s serotipom *E. coli* O157:H7 dovolj manj kot 70 cfu/g bakterij v zaužiti hrani (Dundas in Todd, 1998).

2.5.6 Epidemiologija

O enterohemoragični *E. coli* so prvič poročali Riley in sodelavci leta 1983 (Riley in sod., 1983). V ZDA in azijskih državah se okužbe z EHEC pojavljajo sezonsko, z vrhom okužb v poletnih mesecih. Po podatkih Evropskega centra za obvladovanje in nadzorovanje bolezni je v evropskih državah največ okužb z verotoksigenimi bakterijami *E. coli* pozno poleti (avgust−september), število okužb je do leta 2008 ostalo na dokaj enaki ravni, največ obolelih je bilo med otroci do petih let starosti (ECDC, 2010). Poleti 2011 so se v Nemčiji z do tedaj redkim serotipom EHEC okužili številni ljudje, za posledicami so nekateri tudi umrli. Posamični primeri so se pojavljali po vsej državi in tudi drugod po Evropi (Askar in sod., 2011).

V Združenih državah so po podatkih Centra za preprečevanje in nadzor bolezni − CDC (*angl. Centers for Disease Control and Prevention*) − okužbe z bakterijami *E. coli* O157:H7 četrte

najpogostejše alimentarne okužbe (CDC, 1997). V deželah v razvoju pa so pogostejši enteropatogeni in enterotoksigeni sevi *E. coli* (Albert in sod., 1995).

Prisotnost bakterije *E. coli* v vodi in hrani je pokazatelj fekalne kontaminacije. Na podlagi stalnega spremljanja njihovega števila v školjkah so školjčišča kategorizirana v več kategorij. V školjkah iz kategorije A število *E. coli* ne presega 230 kolonij v 100 g in se lahko neposredno uporabljajo za prehrano ljudi. V kategoriji B je dovoljeno število *E. coli* do 4600 v 100 g, školjke morajo v postopek prečiščevanja preden gredo na trg. V kategoriji C je dovoljeno število do 46.000 v 100 g školjk (EC 854/2004).

Školjke v kategoriji B ali C je treba pred prodajo prečiščevati, da zadostijo kriterijem kategorije A (Uredba ES št. 854/2004 in 2074/2005). Uredba ES št. 2074/2005 predpisuje referenčno analizno metodo ISO TS 16649-3, s katero ugotavljamo število β-glukoronidazno pozitivnih bakterij *E. coli* z uporabo pet-epruvetnega tri dilucijskega testa MPN (*angl. Most Probable Number*).

Le na podlagi povečanega števila bakterij *E. coli* v živilih ne moremo sklepati tudi na prisotnost patogenih sevov, saj so v školjkah dokazani zelo različni sevi (Gourmelon in sod., 2006).

2.5.7 Zakonodaja in pristopi za ugotavljanje bakterije VTEC v živilih

Infekcije z verotoksigenimi sevi *E. coli* so vključene v del A Aneksa I Direktive 2003/99/EC. Na podlagi presoje nacionalnih referenčnih laboratorijev v posvetu z organi Evropske unije sta za ugotavljanje verotoksigenih bakterij *E. coli* iz fecesa, hrane ali okoljskih vzorcev priporočena dva načina: prvi je iskanje verotoksinov in/ali prisotnosti genov *vtx* v njihovem genetskem zapisu, drugi je neposredno odkrivanje različnih seroloških skupin VTEC iz obogatitvenih gojišč in naknadno ugotavljanje toksinov.

V preteklosti so bile študije usmerjene predvsem na ugotavljanje serotipa O157:H7 pri govedu, saj je bilo največ obolelih ravno zaradi uživanja govejega mesa. Postopek izolacije bakterije je vključeval inkubacijo vzorca v obogatitvenem gojišču, imunomagnetno separacijo (IMS) in cepitev kulture na trdno gojišče (Chapman in sod., 1994). Zaradi vse pogostejših primerov obolenj z drugimi serotipi: O26, O103, O111 in O145 (Jenkins in sod., 2003; Pearce in sod., 2004) pa se metoda IMS uporablja tudi za ugotavljanje teh serotipov. Predobogatitev poveča občutljivost metode in zviša nivo detekcije (Chapman in sod., 1994).

Za detekcijo sevov uporabljamo metode verižne reakcije s polimerazo za hkratno dokazovanje Vtx1, Vtx2 ter intimina (Paton & Paton, 1998). Objavljeni so tudi številni začetni oligonukleotidi za dokaz genov *vtx1 in vtx2* (podenote A in B) (Paton & Paton, 1998; Piérard in sod., 1998; Nielsen in Andersen, 2003; Pollard in sod., 1990) in gena eaeA (Karch in Bielaszewska, 2001).

2.6 Norovirusi

2.6.1 Odkritje in poimenovanje

Prvi opisani primeri gastroenteritisov, ki so jih povzročili kalicivirusi, so iz leta 1929, ko je bolezen Zahorsky poimenoval »hyperemesis hemis« oziroma »zimsko obolenje z bruhanjem« (Zahorsky, 1929).

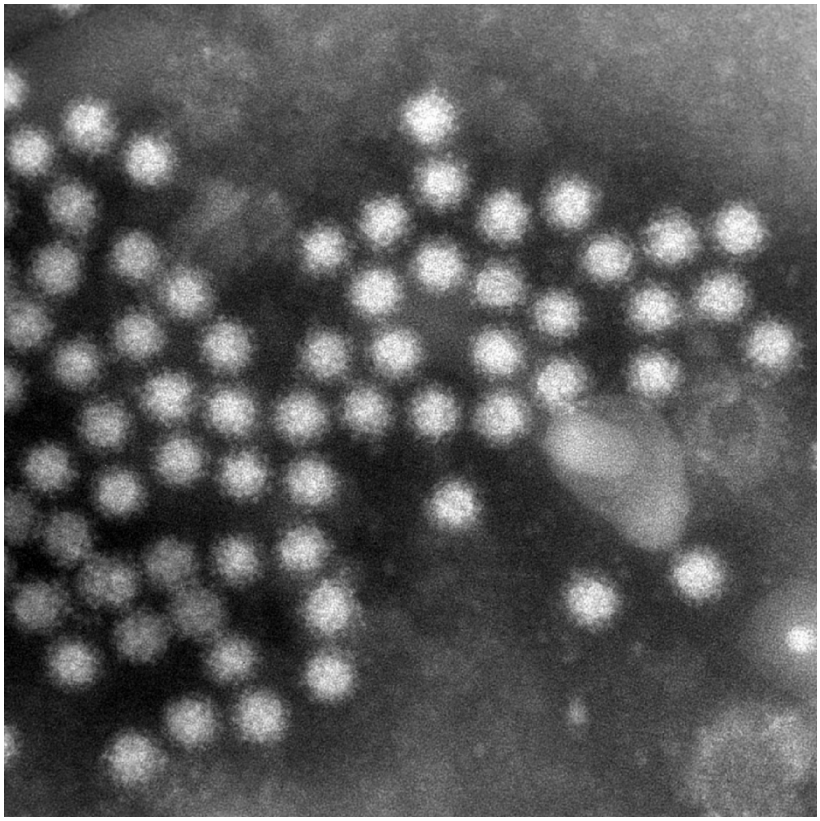
Ime norovirusi izhaja po mestu Norwalk v ZDA, kjer je bil leta 1968 v osnovni šoli prvi izbruh bolezni. Klinični znaki so bili slabost, bruhanje in trebušni krči (Alder in Zickl, 1969). Ker bakterij kot vira infekcije niso mogli dokazati, so posumili, da gre za virusne povzročitelje. Z infektivnim agensom so eksperimentalno uspešno okužili prostovoljce, še vedno pa ga niso mogli potrditi s celičnimi kulturami.

Šele tri leta kasneje je uspelo z elektronskim mikroskopom odkriti 27 nm velike virusne delce (slika 11) (Kapikian in sod.,1972), saj je metoda uspešna le, če je v vzorcu zadostno število virusov (Atmar in Estes, 2001).

2.6.2 Klasifikacija

Noroviruse poleg rodov Lagovirus, Vesivirus in Sapolike virus uvrščamo v družino *Caliciviridae* (Green in sod., 2000).

Gensko in antigensko so zelo raznoliki (Scipioni in sod., 2008). Na podlagi primerjave sekvenc genov, ki kodirajo protein virusne ovojnice (kapsido), so norovirusi razdeljeni v pet genskih skupin − GG (*angl. genogroup*), vsaka izmed teh se še naprej deli na genotipe; na primer v genski skupini II jih je 12 (Vinjé in sod., 2004).



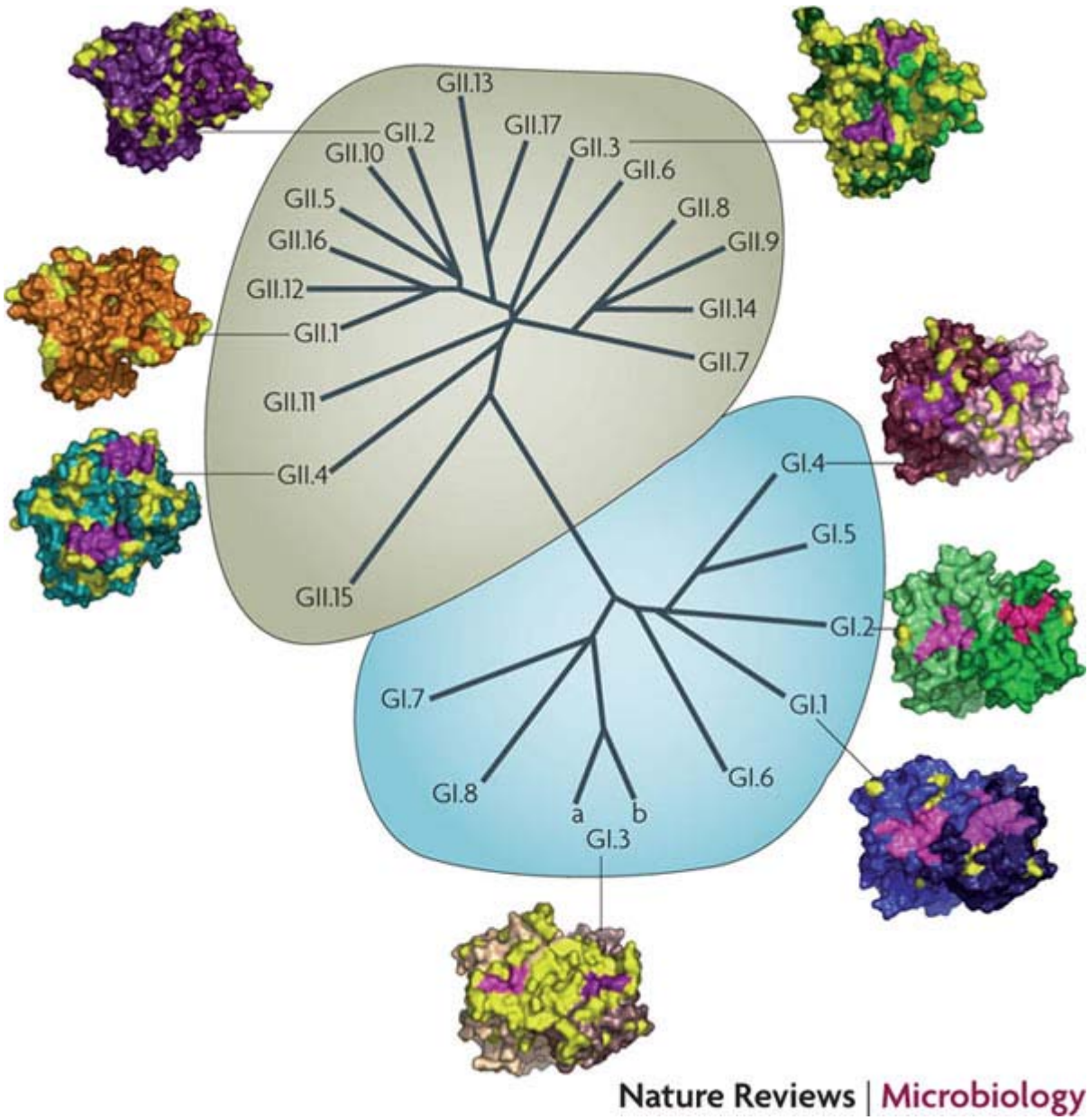
Slika 11: Elektronsko mikroskopski posnetek norovirusnih virionov (Avtor: Kjell-Olof Hedlund, Swedish Institute for Communicable Disease Control. Spletna stran: http://www.smittskyddsinstitutet.se/presstjanst/pressbilder/virus/).

Humani sevi spadajo v genske skupine I, II in IV (Green in sod., 2000; Vinjé in sod, 2000). Najpogostejši so sevi iz skupine I in II (slika 12). Za uvrstitev seva norovirusov v določen genotip mora biti aminokislinsko zaporedje v kapsidnem delu genoma identično v več kot 80 %. V polimeraznem delu (RdRp) ORF1 se mora sev ujemati v najmanj 85 % nukleotidnega zaporedja za gensko skupino I in v najmanj 90 % za gensko skupino II (Vinjé in sod., 2000). Znotraj genske skupine I tako razlikujemo 16 genotipov, medtem ko jih je v genski skupini II 23 (Zheng in sod., 2006).

Tudi živalski sevi (prašičji) spadajo v skupino II in so s humanimi tudi najbolj sorodni (Wang in sod., 2005, 2007). V Sloveniji so Zimšek Mijovski in sodelavci v letih 2004 in 2005 pri 1,2 % farmskih prašičev ugotovili noroviruse, vendar so detektirani sevi pripadali drugim genotipom: II.11 in II.18 (Zimšek Mijovski in sod., 2010), kot humani sevi dokazani na področju Slovenije.

Porast norovirusnih okužb v svetu je v največji meri povezana s sevi iz genske skupine II.4, tako ugotavljamo v obdobju 2–3 let nove genske različice (Zheng in sod., 2010).

Razvoj genotipa II.4 je posledica različne vezave na receptorje in novih antigenskih lastnosti, virusi se tako neprestano razvijajo v nove genske različice (Lindesmith in sod., 2008). Raziskovalci domnevajo, da so se norovirusi iz genske skupine I razvijali v manjši meri ter z manj fenotipskimi spremembami kot norovirusi iz skupine II zaradi selekcije v kapsidnem proteinu, kjer so določene strukture nujne za normalno funkcijo virusa (Donaldson in sod., 2010).



Slika 12: Filogenetska razvrstitev norovirusov. Sevi norovirusov iz genetske skupine I so v modrem, genetska skupina II v sivem oblaku. Obarvane strukture prikazujejo najpogostejše genetske tipe pri ljudeh (v ZDA). Z rumeno barvo so prikazane različice štrleče domene P2, v barvi fuksije mesta vezave na HBGA. Povzeto po Donaldson in sod., 2010.

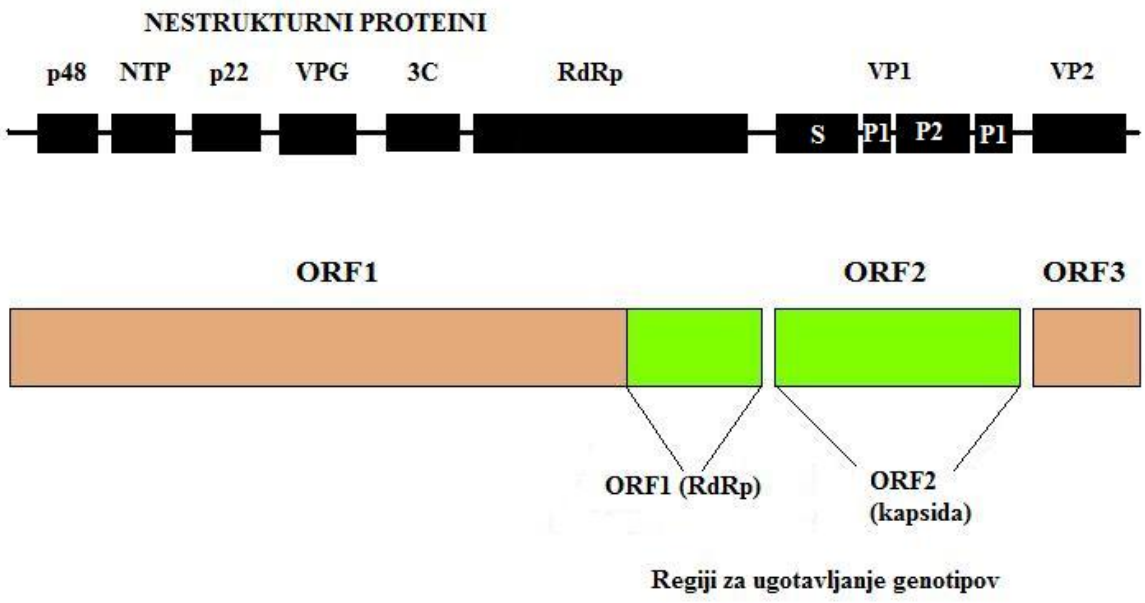
2.6.3 Zgradba norovirusnega genoma

Norovirusi imajo linearno molekulo pozitivno polarne enovijačne RNA. Norovirusni genom je dolg 7,5−7,7 kb in vsebuje tri odprte bralne okvirje − ORF (*angl. open reading frame*). ORF1 kodira za encim helikazo, proteazne peptide in od RNA odvisno RNA polimerazo (RdRp), ORF2 kodira glavni kapsidni protein (VP1), ORF3 pa manjši strukturni protein, (VP2) kar shematsko prikazuje slika 13 (Green in sod., 2000). Polimerazni del je zelo ohranjen del njihovega genoma, objavljeni so številni začetni oligonukleotidi (Le Guyader in sod., 1996a; Vinjé in sod., 1996; Wang in sod., 2006), ki nalegajo v tem delu genoma.

Kapsido sestavlja 180 kapsidnih proteinskih monomerov, ki sooblikujejo značilno ikozaedrično obliko. Vsak izmed teh monomerov ima dve glavni podenoti (domeni): skorjo (S) in štrleče roke (P), povezanih z 8 aminokislinami. Domena S kodira za notranji plašč kapside, C-konec domene P pa oblikuje loku podobno strukturo, ki se podaljša iz kapside.

Domeno P sestavljata zgib (P1) in štrleča domena (P2) (Prasad in sod., 1999).

Štrleča domena vsebuje zelo raznolike sekvence, je na površini kapside in je izpostavljena prepoznavanju različnih gostiteljskih celic in vezavo na celice sesalcev. Pri ljudeh so to antigeni krvnih skupin HBGA (*angl. Human Blood Group Antigen*) (Tan in sod., 2004).



Slika 13: Shematski prikaz norovirusnega genoma.

Norovirusi so zelo heterogena skupina virusov, pri katerih so pogoste rekombinacije. To omogoča virusom, da se razvijajo v nove genetske različice. Študije kažejo na to, da so rekombinacije povsem naravne, saj so antigenske domene v genu za kapsidni protein izpostavljene pritisku imunskega odziva gostitelja (Rohayem in sod., 2005).
Ločimo rekombinacije med različnimi genskimi skupinami, med genotipi ter znotraj genotipa (Bull in sod., 2007; Phan in sod., 2007).

2.6.4 Razširjenost okužb z norovirusi

Norovirusi so glavni povzročitelji gastroenteritisov. Več kot 90 odstotkov vseh virusnih okužb in polovico vseh epidemij gastroenteritisov po svetu je norovirusnega izvora (Inouye in sod., 2000; Fankhauser in sod., 2002; Lopman in sod., 2003). Od takih, ki so prijavljeni nadzornim službam, jih skoraj 50 % povzročajo norovirusi. Podobne številke veljajo za ZDA, Finsko, Švedsko, Nizozemsko, Nemčijo, Japonsko in Slovenijo (Widdowson in sod., 2005; Lopman in sod., 2002).
Kljub temu da je vrhunec vseh pojavov »zimskih drisk« v hladnejših obdobjih (Poljšak Prijatelj in sod., 2004), je posamične primere zaznati čez vse leto. Dokumentiran primer v Sloveniji leta 2007 to tudi potrjuje (Grmek Košnik in sod., 2007).

2.6.5 Klinični znaki in vir okužbe

Najpogostejši je alimentarni vir okužbe (zaužitje okuženih školjk), kontaktni (prenos iz osebe na osebo) in hidrični (s kontaminirano vodo). Norovirusi se na prebavne žleze školjk vežejo aktivno, z ogljikovodikovimi vezmi, podobno kot na človeške tkivno krvne antigene (Le Guyader in sod., 2006a), saj je sestava le-teh podobna antigenom školjk (Tian in sod., 2006). Tako vezani ostajajo lahko več tednov kljub depuraciji, medtem ko se bakterije iz školjk očistijo v 2−3 dneh (Greening in sod., 2003; Loisy in sod., 2005a; Schwab in sod., 1998).
Infekcijska doza je nizka, opisujejo, da je za okužbo zadostuje 10−100 virusnih delcev (Teunis in sod., 2008).
Inkubacijska doba pri ljudeh traja 1–3 dni. Znaki okužbe so poslabšanje počutja, povišana telesna temperatura, pojavi se bruhanje in driska. Simptomi po dveh ali treh dneh minejo. Pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom, bolnikih, ki imajo tudi druge bolezni, in pri starejših (Goller in sod., 2004) so lahko znaki težji: gastroenteritis, napadi bruhanja (Caul in sod., 1996).

Med ljudmi se navadno širijo po fekalno-oralni poti. Pogosto so klicenosci tisti, ki okužijo živila. Pacient je lahko že popolnoma zdrav, z blatom pa še vedno izloča velike količine virusov − 10^8 in tudi več kot 10^{10} RNA kopij/g. Ob tem tudi bolniki, ki so klinično že zdravi, izločajo viruse. Ob neustrezni osebni higieni in veliki odpornosti virusa tako naglo pride do novih okužb (Lee in sod., 2007; Tu in sod., 2008).

2.6.6 Patogeneza

Podatki o patogenosti in imunosti so dobljeni predvsem na študijah prostovoljcev (Wyatt in sod.,1974; Parrino in sod., 1977; Johnson in sod., 1990).

Dela populacije ni bilo mogoče okužiti z norovirusi in le pri polovici inficiranih se je bolezen tudi razvila. Vzrok za to pripisujejo genotipu ljudi, prisotnosti receptorjev za krvne antigene in antigene v črevesju ter različno izražanje receptorjev HBGA (Lindesmith in sod., 2003).

S študijami so ugotovili, da so se osebe s protitelesi za norovirusni antigen lažje ponovno okužile kot tiste, ki še niso bili v stiku. To so si razlagali z genetsko določenimi faktorji gostitelja, ki so v povezavi z vezavo virusnih delcev na človeške antigene. Norovirusi prepoznavajo krvno tkivne antigene sevno specifično (Huang in sod., 2003).

Opisanih je več načinov vezave norovirusov (Harrington in sod., 2004; Huang in sod., 2003; Huang in sod., 2005) na humane antigene HBGA. Za vezavo je ključnega pomena podenota P kapsidnega proteina norovirusov, ki deluje kot receptor (Tan in sod., 2005).

Humani HBGA so po svoji sestavi ogljikovi hidrati povezani z glikoproteini ali glikolipidi in so prisotni na rdečih krvničkah in epitelijskih celicah, nekateri nevezani plavajo v telesnih tekočinah, kot sta slina in kri. Ti antigeni nastajajo s pomočjo encimov – glikoziltransferaz, ki so določene genetsko (krvne skupine ABO, krvne skupine po sistemu Lewisu).

Po podatkih Hutsona in sodelavcev so na študijah prostovoljcev prišli do zaključkov, da se z norovirusi največkrat okužijo ljudje krvne skupine 0, najmanjkrat pa osebe skupine B (Hutson in sod., 2002).

Infekcija z norovirusi je uspešna pri ljudeh, ki imajo na črevesnih epitelijskih celicah receptorje za vezavo, nosilci gena FUT2 (*angl. fucosyltransferase 2 gene*), ki so t. i. sekretorji Se^+. Pri t. i. nesekretorjih (Se^-), ki takih receptorjev nimajo, okužb niso mogli dokazati tudi pri zelo visoki infekcijski dozi (Lindesmith in sod., 2003).

2.6.7 Epidemiologija

Norovirusi so pogosto vzrok izbruhov v okoljih, kjer je prisotna množica ljudi, znani so tudi sporadični primeri virusnih gastroenteritisov (Patel in sod., 2008; Kirkwood in sod., 2005; Lau in sod., 2004; Colomba in sod., 2007; Schnagl in sod., 2000; Zintz in sod., 2005; Lee in sod., 2007).

V letu 2000 so bile v Sloveniji prijavljene prve epidemije, ki so jih povzročili človeški kalicivirusi (Zimšek in sod., 2003; Poljšak Prijatelj in sod., 2001a). Od takrat so se zvrstile številne epidemije v ustanovah, ki oskrbujejo večje skupine ljudi (bolnišnice, domovi za starejše, vojašnice, vrtci, šole) (Poljšak Prijatelj in sod., 2001b; Poljšak Prijatelj in sod., 2001c; Štrumbelj in sod., 2003; Poljšak Prijatelj in sod., 2004; Grmek Košnik in sod. 2007).

2.6.8 Diagnostika

Za izolacijo in razmnoževanje norovirusov zaenkrat nimamo na voljo celičnih modelov (Duizer in sod., 2004; Straub in sod., 2007). Za diagnostiko se je dolgo časa uporabljala elektronska mikroskopija, vendar je dokaj neobčutljiva. Da dokažemo noroviruse v suspenziji iztrebka, mora biti v gramu vsaj 10^5–10^6 virusnih delcev (Koopmans in sod., 2002). Nekateri tudi nimajo značilne morfologije kalicivirusov, kar dodatno otežuje detekcijo (Hauffman in sod., 2003).

Vsaka izmed metod za ugotavljanje norovirusov v školjkah ima določene omejitve. Prav zato so se pojavile številne modifikacije (Lees in sod., 1995; Atmar in sod., 1995; Jaykus in sod., 1996; Traore in sod., 1998; Shieh in sod., 1999; Legeay in sod., 2000; Kingsley in Richards, 2001). Zaradi velike heterogenosti skupine norovirusov so objavljeni številni oligonukleotidni začetniki, ki zaznavajo dele genoma, molekularne metode določevanja pa je treba zaradi narave genoma kalicivirusov ves čas nadgrajevati.

Za uspešno detekcijo virusov je treba viruse sprostiti iz školjčnega tkiva (prebavnih žlez) ter nato prečistiti in ekstrahirati virusno RNA. Obstajajo številne modifikacije za ekstrakcijo virusne RNA iz matriksa školjk, ki je zaradi prisotnih inhibitorjev pogosto moteč dejavnik pri detekciji virusne RNA (Comelli in sod., 2008): s postopkom adsorpcije v kislih medijih (Mullendore in sod., 2001), alkalne adsorpcije z glicinskimi pufri (Myrmel in sod., 2004) ali z nevtralnimi pufri (Atmar in sod., 1995). Virusne delce iz tkiva sprostimo tudi z delovanjem encima proteinaze K (Jothikumar in sod., 2005). Po delovanju encima se iz celic sprostijo virioni, iz tako pripravljene suspenzije po centrifugiranju virusno RNA izoliramo z gvanidinijevim izotiocianatom in vezavo na silikonsko membrano ter jo končno speremo in

tako pripravimo za RT-PCR ali RT-PCR v realnem času (Boom in sod., 1990), metodo so opisali tudi Jothikumar in sodelavci (Jothikumar in sod., 2005). Razvili so tudi podobno metodo z manjšimi modifikacijami s proteinazo K, ki naj bi bila bolj učinkovita kot alkalna elucijska metoda (Greening in sod., 2008). Viruse koncentriramo iz pripravljene suspenzije z obarjanjem s polietilenglikolom (Traore in sod., 1998; Le Guyader in sod., 2006; Loisy in sod., 2005b), s flokulantom CatFloc (Atmar in sod., 1995) ali ultracentrifugiranjem (Muniain-Mujika in sod., 2000). Opisani so tudi postopki z drugimi kemikalijami, kot so freon in kloroform (Mullendore in sod., 2001), ter s kombinacijo kloroforma in butanola (Atmar in sod., 1995). Za izolacijo virusne nukleinske kisline so na tržišču tudi komercialnimi testi (de Roda Hausman in sod., 2007).

Opisani postopki se uporabljajo v različnih kombinacijah v težnji, da dobimo koncentrirano RNA v čim manjših volumnih. Kjub temu je zelo težko primerjati vse metode in izbrati najboljšo, saj so v poskusih uporabljene različne vrste školjk in še bolj številčni sevi virusov (Comelli in sod., 2008).

Za dokazovanje virusne RNA se uporabljata polimerazna verižna reakcija s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) ter RT-PCR v realnem času. Avtorji navajajo številne oligonukleotidne začetnike ter sonde, ki temeljijo na sistemu TaqMan in zaznavajo v regiji stika ORF1 in ORF2 (Fankhauser in sod., 2002), ki je najbolj ohranjen del norovirusnega genoma (Katayama in sod., 2002).

Za RT-PCR so pogosto uporabljeni oligonukleotidni začetniki JV12Y/JV13I, ki nalegajo v polimerazni regiji. Z njimi ugotavljamo noroviruse obeh genetskih skupin I in II (Vennema in sod., 2002).

V Evropskem referenčnem laboratoriju za virusno in bakteriološko kontaminacijo školjk (Cefas, Velika Britanija) uporabljajo metode, ki so priporočene v standardu za kvantifikacijo norovirusov v živilih, razvite v skupini za standardizacijo − CEN (*fr. Comité Européen de Normalisation*) in ISO (*angl. International Standard Organisation*).

2.6.9 Zakonodaja

Trenutno v Evropski uniji še nimamo obveznih regulativ in tudi ne objavljenih referenčnih metod za testiranje školjk na noroviruse.

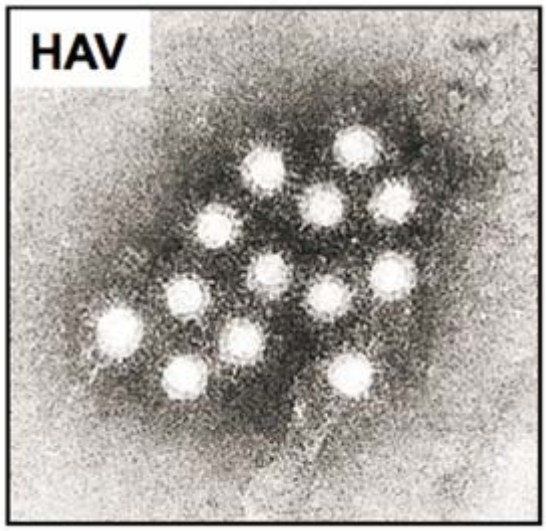
Tehnično svetovalna skupina za ugotavljanje virusov v hrani (TAG 4), delovna skupina (W6) v Tehničnem odboru za horizontalne metode za analizo živil (TC275) Evropskega odbora za

standardizacijo (CEN) validira standardne metode za ugotavljanje norovirusov v mehkužcih, sadju, listnati zelenjavi in ustekleničeni vodi (Costafreda in sod., 2006; Vinjé in sod., 2003).

2.7 Virus hepatitisa A

2.7.1 Odkritje in poimenovanje

Prvi opisan izbruh hepatitisa A je bil leta 1955 na Švedskem. Do izbruha je prišlo zaradi uživanja okuženih ostrig (Roos, 1956). Virus so z elektronskim mikroskopom odkrili leta 1973 (Feinstone in sod., 1973) (slika 14).



Slika 14: Elektronski posnetek virusa hepatitisa A. Povzeto po: Kumar in sod., 2010.

2.7.2 Klasifikacija

Virus ima linearno molekulo, enovijačne RNA pozitivne polarnosti brez ovojnice. Je eden najmanjših in enostavno grajenih virusov, velik je 27–32 nm. Sedemdeset odstotkov virusa predstavlja virusni protein, trideset pa ribonukleinska kislina (Lemon, 1994). Uvrščamo ga v rod *Hepatovirus* in družino *Picornaviridae*. Virus se od drugih predstavnikov te družine razlikuje, saj za rast na celični kulturi potrebuje daljše adaptacijsko obdobje, razmnožuje se zelo počasi in le redko povzroča citopatski učinek (Cromeans in sod., 1987; Lemon, 1992).

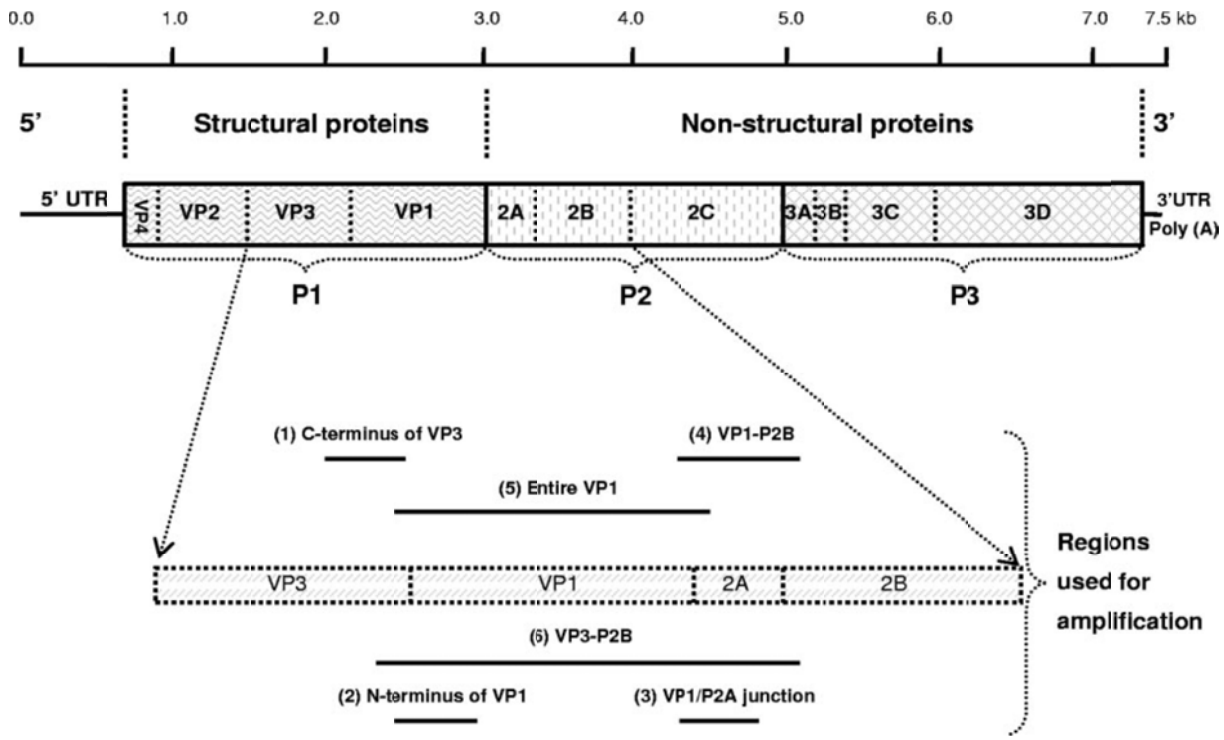
Znotraj enega serotipa razlikujemo več genetskih različic hepatitisa A, vendar infekcija z enim sevom omogoča doživljenjsko imunost (Jansen in sod., 1990) in tudi zaščito proti drugim virusnim sevom (Costa-Mattioli in sod., 2003; Nainan in sod., 2005). V variabilnem

delu regije VP1-P2 razlikujemo na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju šest virusnih genotipov (Robertson in sod., 1992; Lu in sod., 2004).

Genotipi I, II, III so patogeni za ljudi, medtem ko so genotipe IV, V in VI ugotovili le pri opicah (Lu in sod., 2004; Jansen in sod., 1990; Robertson in sod. 1992; Arauz-Ruiz, 2001). Pri ljudeh sta najpogostejša genotipa I (podtipom A in B) in III, slednji ima prav tako dva podtipa: A in B. Osemdeset odstotkov okužb predstavlja genotip I, precej manj genotip III. Genotip IA je bolj razširjen kot genotip IB in se pojavlja pri ljudeh po celem svetu, genotip IB se pojavlja le v mediteranskih deželah. Z genotipom III so se okužili ljudje na Švedskem ter v Indiji in Nepalu (Khanna in sod., 1992).

2.7.3 Zgradba genoma

Genom virusa hepatitisa A je dolg 7,5 kb, sestavljen je iz petih podenot (slika 15). Nekodirajoča regija 5' (5'UTR) je dolga približno 600 nukleotidov in je najbolj ohranjena regija v genomu (Weitz in sod., 1986). Na drugem koncu, nekodirajoči regiji 3' (3'UTR), se nahaja zaporedje aminokislin adeninov (*angl. poly-A*) (Cohen in sod., 1987), ostali del genoma je odprt bralni okvir, ki se prepiše v protein. Ta je razdeljen na tri regije, ki jih označujemo s P1, P2 in P3. Regija P1 kodira polipeptide, ki posttranslacijsko oblikujejo kapsido, medtem ko se P2 in P3 pretvorita v nestrukturne polipeptide, ki sodelujejo pri virusni replikaciji (Totsuka in Moringsu, 1999).



Slika 15: Shematski prikaz genoma virusa hepatitisa A z regijami, ki se uporabljajo za pomnoževanje (1−5). Povzeto po Nainan in sod., 2006.

2.7.4 Razširjenost

Prenaša se fekalno-oralno od okužene na dovzetno osebo ali iz skupnega vira z onesnaženo pitno vodo oziroma živili. Pojavlja se sporadično in epidemično. Epidemije se pojavljajo med otroci in mladino, med souporabniki pribora za parenteralno injiciranje drog in med pripadniki homoseksualnih skupin (Reintjes in sod., 1999; Kumar in sod., 2010).

Incidenca infekcij s hepatitisom A je večja v zahodnoevropskem območju zaradi zmanjšane imunosti v populacijah, ki živijo v višjem higienskem standardu.

Pogostnost infekcij se med državami razlikuje. V deželah z nizkim higienskim standardom je bolezen endemska (Azija, Afrika, Latinska Amerika, Bližnji vzhod) (Hadler, 1991). Večina ljudi se okuži v dobi otroštva in so kot odrasli imuni. Drugače je v razvitih deželah, kjer je življenjski standard višji, bolezen se pojavlja relativno redko in zato je večina ljudi dovzetnejša za okužbo (Mackiewicz in sod., 2005). Infekcija odraslih povzroča težjo klinično sliko kot pri otrocih (Lednar in sod., 1985).

Virus nima virusne ovojnice in je zelo odporen na zamrzovanje, UV-žarke, pH (obstojni so v območju pH od 3−4 do 9−10) in razkužila (Siegl in sod., 1984). Tudi v organski snovi, kot so

fekalije, virus ostane kljub sušenju infektiven še en mesec (McCaustland in sod., 1982). V vodi, vodnih usedlinah ali školjkah ostaja več tednov ali mesecev (Bosch, 1995). V školjkah, ki so izpostavljene kontaminirani morski vodi, virus že v uri in pol doseže najvišji titer. S prečiščevanjem, t. i. depuracijo, se v šestih urah sicer vsebnost virusa v školjkah razpolovi (Franco in sod., 1990), vendar pa viruse popolnoma zelo težko odstranimo.

2.7.5 Patogeneza in klinični znaki

Virus vstopa v telo skozi usta v prebavila, nato pa preko krvnega obtoka v jetra, ki so tudi tarčni organ. V jetrnih celicah se razmnožuje, kar povzroči vnetje jetrnega tkiva. Okužba lahko poteka tudi brez znakov bolezni (asimptomatsko), predvsem pri otrocih (Hadler in sod., 1980). Iz črevesja virus preide v jetra, kjer se razmnožuje, nastopi viremija, preko žolča pa se virus izloča v blato. Zaradi poškodb jetrnih celic se ne vrši razgradnja hemoglobina, posledično se v telesu začne nalagati bilirubin, bolnik pa postane zlateničen. Po dveh do treh tednih se razvije imunski odgovor.

Inkubacijsko obdobje traja 2–6 tednov. V predzlateničnem stadiju se bolnik slabo počuti, je utrujen, ima glavobole, bolečine v sklepih in mišicah, je brez teka, bruha in ima rahlo povišana telesno temperaturo.

V zlateničnem obdobju, ki običajno traja nekaj tednov, je urin temnejše obarvan, blato postane sive barve, splošno počutje se pri bolniku izboljša, povrne se apetit, telesna temperatura se normalizira.

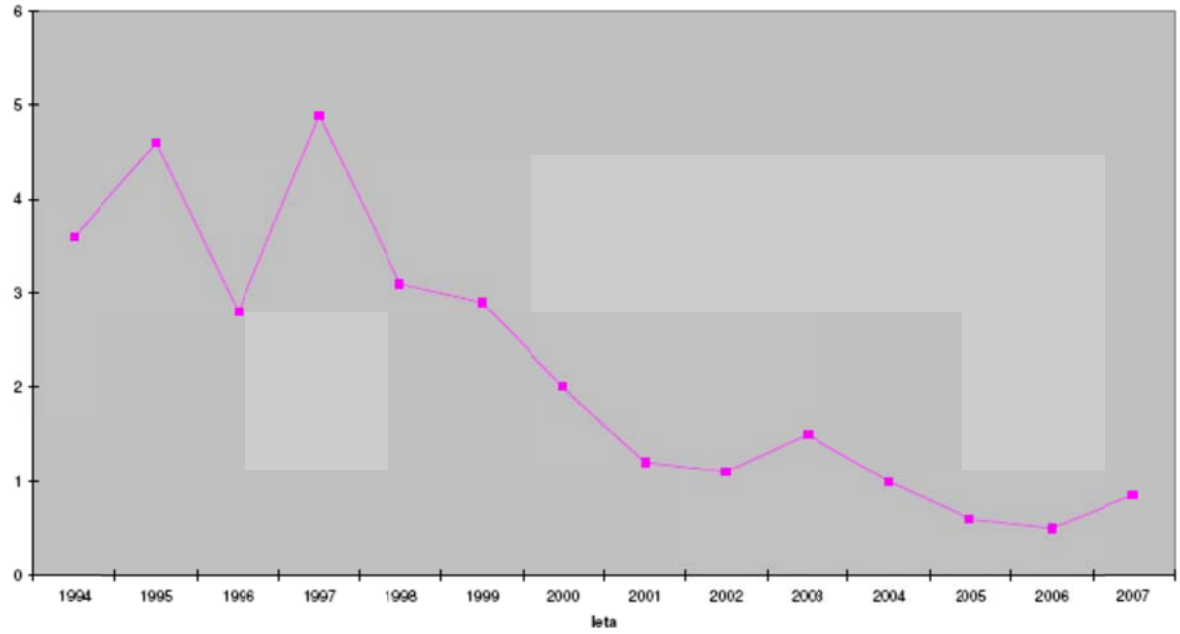
Obdobje okrevanja navadno nastopi konec tretjega tedna. Večina bolnikov ozdravi brez zapletov po nekaj tednih. Smrtni izidi so redki. Po preboleli bolezni nastopi trajna odpornost (Kumar in sod., 2010).

2.7.6 Epidemiologija

V Evropski uniji je po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni v zadnjih desetih letih incidenčna stopnja hepatitisa A upadala (iz povprečja 15,1 na 100.000 prebivalcev leta 1996 na 3,9 na 100.000 v letu 2006) (ECDC, 2008). Bolezen se je pojavljala predvsem med mlajšimi odraslimi osebami, kar je pogojevalo težo bolezenske slike. Epidemije hepatitisa A znotraj EU so predvsem posledica vnosa virusa hepatitisa A v skupine bolj ogroženega dovzetnega prebivalstva (romsko prebivalstvo – Slovaška, narkomani − Češka in Latvija) (ZZV, 2009).

V Sloveniji je bila leta 2006 incidenca 0,5, leta 2007 0,75 in leta 2008 0,85, kar jo uvršča med dežele z najmanjšim deležem (ECDC, 2010).

Skupno število dokazanih primerov hepatitisa A v Sloveniji je bilo že okoli leta 2000 nizko. Pojavljali so se manjši izbruhi (slika 16). V zadnjih osmih letih ni ugotovljenih epidemij, vse bolj pogosti pa postajajo vneseni primeri (ZZV, 2009).

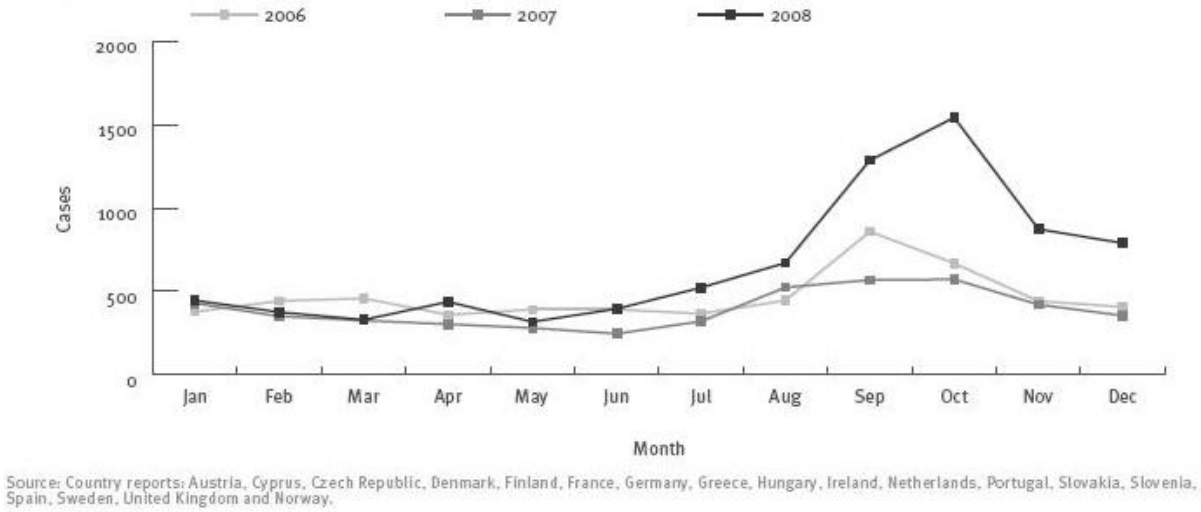


Slika 16: Incidenčna stopnja hepatitisa A v Sloveniji. Vir: Poročilo Centra za epidemiologijo ZZV, 2009.

V deželah z nizkim higienskim standardom je hepatitis A stalno prisoten med prebivalci. Ker je virus hepatitisa A navzoč v blatu že od dva do tri tedne pred nastopom bolezenskih znakov, omogoča širjenje okužbe v nezadostno higiensko urejenih okoljih. Pri zatiranju epidemij se izvaja cepljenje izpostavljenih oseb, svetuje zdravstveno vzgojo, dvig higienske ravni in osamitev obolelih (ZZV, 2009; IVZ, 2009).

V razvitih državah z visokim življenjskim standardom so okužbe z virusom hepatitisa A redke. Največji izbruh bolezni je bil leta 1988 na Kitajskem, ko je zbolelo 300.000 ljudi, ki so jedli surove školjke (Halliday in sod., 1991).

Tudi v ZDA (Richards, 1985; Rippey, 1994), Veliki Britaniji (Bostock in sod., 1979; Sockett in sod., 1993), Italiji (Malfait in sod., 1996) in Franciji (Apaire-Marchais in sod., 1995, Guillois in sod., 2009) so se okužili s školjkami. Bolezen se v državah Evropske unije pojavlja sezonsko z največjim številom obolelih med septembrom in oktobrom (slika 17) (ECDC, 2010).



Slika 17: Časovna razporeditev ugotovljenih primerov hepatitisa A v državah EU v letih 2006–2008. Vir: Letno poročilo Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (2010), spletna stran ecdc.europa.eu

Školjke se prehranjujejo s hranili, pridobljenimi s filtriranjem morske vode, in se tako tudi kontaminirajo, ko pridejo v stik s fekalnimi odplakami. Po podatkih iz literature so poglavitni vzrok vseh primerov hepatitisa A školjke ter tudi zelenjava in sadje (Cliver, 1985; Fiore, 2004).

Prenos okužbe je lahko posreden, ko okužena oseba zaradi nehigienskega rokovanja, živilo ali vodo kontaminira, ali neposreden, s človeka na človeka (Pontrelli in sod., 2008) − z izločki obolelega, s slino in s spolnim kontaktom (analno-oralni stik) (Reintjes in sod., 1999).

Epidemiologi opozarjajo na nujnost cepljenja potnikov proti hepatitisu A, kar je običajno že načrtovano v imunizacijskih programih evropskih držav (ZZV, 2009). V Sloveniji je cepljenje obvezno za osebe, ki so pri svojem delu izpostavljene okužbi; na primer zaposleni v komunalnih dejavnostih.

Za okužbo naj bi bilo dovolj že 10−100 virusnih delcev (FDA, 1992), medtem ko oboleli izločajo množico virusov (10^5–10^{11} v gramu blata) (Bosch, 1998).

2.7.7 Diagnostika

Virus je zaradi slabega prilagajanja težaven za gojenje na celičnih kulturah, zato se za dokazovanje virusne nukleinske kisline uporabljata predvsem metodi RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Za dokazovanje virusa je treba virusno RNA najprej sprostiti iz tkiva školjk in jo izolirati s čim manj prisotnimi inhibitorji. Poznane so številne metode izolacije RNA in njihove modifikacije, podobno kot pri norovirusih: s pufri (Legeay in sod., 2000; Mullendore in sod., 2001; Myrmel in sod., 2004), z elektroliti, z organskimi topili (Atmar in sod., 1995; Jothikumar in sod., 2005; Boom in sod., 1990; Jothikumar in sod., 2005), z obarjanjem s polietilenglikolom (Traore in sod., 1998; Le Guyader in sod., 2006; Loisy in sod., 2005b), s flokulantom CatFloc (Atmar in sod., 1995) ali ultracentrifugiranjem (Muniain-Mujika in sod., 2000). Tudi postopki z drugimi kemikalijami, kot so freon in kloroform (Mullendore in sod., 2001), ter s kombinacijo kloroforma in butanola (Atmar in sod., 1995), poleg tega so na tržišču tudi številni komercialnimi testi (de Roda Hausman in sod., 2007).

Za detekcijo se največkrat uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki nalegajo v virusnem genomu na mestih, kot so prikazani na sliki 15: (1) C konec regije VP3 (2,020 nt−2,226 nt); (2), N konec regije VP1 (2,172 nt −2,415 nt); (3), stik regij VP1/P2A (2,984 nt−3,217 nt); (4) regija VP1-P2B (2,896 nt−3,289 nt); (5) celotna regija VP1 (2,172 nt−3,125 nt); (6) regija VP3-P2B (2,133 nt3,289 nt) glede na referenčni sev HM175 (Cohen in sod., 1987).

2.7.8 Zakonodaja

Okužbe z virusom hepatitisa A je treba obvezno prijavljati v Evropski center za nadzor bolezni (ECDC). V Sloveniji je po Zakonu o nalezljivih boleznih (ZNB) (Ur.l. RS št 33/06), ki opredeljuje nalezljive bolezni, prijava bolezni obvezna. Ta poteka skladno s Pravilnikom o prijavi nalezljivih bolezni in posebnih ukrepih za njihovo preprečevanje in obvladovanje (Ur. l. RS št. 16/99).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 VZORCI

Za izvedbo poskusov smo uporabili mediteranske klapavice (*M. galloprovincialis*), nabrane v školjčiščih slovenskega morja. V letih 2006, 2007 in 2008 smo zbrali 168 vzorcev in jih pregledali na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* in VTEC ter na noroviruse in virus hepatitisa A. V letu 2006 smo ugotavljali prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* v 62 vzorcih, leta 2007 v 32 vzorcih in leta 2008 v 74 vzorcih. Prisotnost VTEC smo v letu 2007 ugotavljali v 39 vzorcih po standardu ISO 16654:2001, leta 2008 pa smo 85 vzorcev preiskali z metodo ELISA (Verotoxin, Ridascreen). Prisotnost norovirusov in virus hepatitisa A smo ugotavljali v 44 vzorcih leta 2006, v 63 vzorcih leta 2007 in v 61 vzorcih leta 2008 (tabela 1). Gojene školjke so izvirale iz školjčišč Strunjan, Seča in Debeli rtič, prosto nabrane iz področja Pirana ali Strunjana.

Tabela 1: Število in vrsta izvedenih preiskav v posameznih letih.

Leto	*V. parahaemolyticus*	VTEC		VIRUSI	
		ISO 16654:2001	ELISA Verotoxin	NOROVIRUSI	HEPATITIS A
2006	62	/	/	44	44
2007	32	39	/	63	63
2008	74	/	85	61	61
skupaj	**168**	**124**		**168**	**168**

3.1.1 Vzorci za preiskavo na bakterijo *V. parahaemolyticus*

Prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* smo ugotavljali v 168 vzorcih. Število opravljenih preiskav v vzorcih školjk iz posameznih školjčiščih oziroma prosto nabranih v letih testiranja so prikazani v tabeli 2.

Tabela 2: Število opravljenih preiskav vzorcev školjk na prisotnost *V. parahaemolyticus* glede na področje rasti in leto izvedbe.

Leto	Seča	Strunjan	Debeli rtič	Prosto nabrane (*)	skupno
2006	26	19	17	0	62
2007	13	11	7	1	32
2008	27	25	17	5	74
skupno	**66**	**55**	**41**	**6**	**168**

3.1.2 Vzorci za ugotavljanje prisotnosti bakterije VTEC in njenih toksinov

Skupno smo v letih 2007 in 2008 na prisotnost verotoksinov in *E. coli* preiskali 124 vzorcev školjk (priloga 7). Števila opravljenih preiskav vzorcev iz posameznih školjčišč oziroma prosto nabranih školjk v letih testiranja so prikazana v tabeli 3.

Tabela 3: Število opravljenih preiskav vzorcev na verotoksine oziroma *E. coli* iz posameznih školjčišč prosto nabranih školjk v letih testiranja.

Leto	Seča	Strunjan	Debeli rtič	Prosto nabrane (*)	skupno
2007	17	14	7	1	39
2008	29	32	16	8	85
skupno	**46**	**46**	**23**	**9**	**124**

(*) Osem vzorcev negojenih školjk je bilo nabranih na področju Pirana, eden pa v okolici Strunjana.

3.1.3 Vzorci za ugotavljanje prisotnosti virusov

Na prisotnost norovirusov in virusa hepatitisa A smo preiskali 168 vzorcev školjk. Število opravljenih preiskav vzorcev iz posameznih školjčišč oziroma prosto nabranih školjk v letih testiranja je prikazano v tabeli 4.

Tabela 4: Preiskane školjke na prisotnost norovirusov in virusa hepatitisa A iz posameznih školjčišč prosto nabranih školjk v letih testiranja.

Leto	Seča	Strunjan	Debeli rtič	Prosto nabrane (*)	skupno
2006	23	10	11	0	44
2007	25	20	16	2	63
2008	23	21	13	4	62
skupno	**71**	**52**	**40**	**6**	**168**

(*) Leta 2007 sta bila vzorca negojenih školjk nabrana na območju Pirana, v letu 2008 so bile nabrane trikrat na območju Pirana in enkrat v Strunjanu.

Školjkam smo po prejemu v laboratorij sterilno oddvojili prebavne žleze in jih homogenizirali z gojiščem MEM (*angl. minimum essential media*, Gibco®, Invitrogen, ZDA) v razmerju 1:1. V sterilnih steklenih epruvetah za homogeniziranje smo tkivo homogenizirali s teflonskim batom (*angl. poter elvehyem*). Pripravljeno vsebino smo prenesli v sterilne epruvetke in jih do uporabe hranili zamrznjene pri −70 °C.

3.2 METODE

– **Priprava vzorcev**

Klapavice smo sprali pod tekočo vodo ter iz njih odstranili pesek in alge. Odprte in poškodovane smo zavrgli. Vzorec je obsegal približno 30 živih školjk, iz katerih smo sterilno oddvojili prebavne žleze za preiskavi na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* in viruse. Za preiskavo na prisotnost VTEC smo uporabili celotno vsebino školjk brez lupine.

3.3 Preiskava na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus*

3.3.1 Priprava vzorcev in izolacija na klasičnem mikrobiološkem gojišču

Za preiskavo smo glede na velikost školjk uporabili od 10 do 15 prebavnih žlez, ki smo jih oddvojili neposredno po prejemu v laboratorij, homogenizirali s teflonskim batom (*angl. potter elvehyem*, Grinder Mills) v sterilnih steklenih epruvetah za homogeniziranje.

a) Vzorec smo razredčili v razmerju 1:9 s sterilno fiziološko raztopino. Iz tako pripravljenega vzorca smo naredili dodatna redčenja in jih cepili na gojišče TCBS (Biolife, Italija) v redčitvah od 10^{-2} do 10^{-4}.

Sestavine za gojišče TCBS, predstavljene v tabeli 5, smo raztopili v vodi in segrevali do vrenja. Petnajst mililitrov gojišča ohlajenega na 45 °C smo razlili v sterilne petrijevke in pustili, da se plošče posušijo. Do uporabe smo jih shranili pri 4 °C.

Tabela 5: Sestava gojišča TCBS.

pepton	10,0 g
kvaščev ekstrakt	5,0 g
natrijev citrat	10,0 g
natrijev tiosulfat	10,0 g
železov III citrat	1,0 g
natrijev klorid	10,0 g
žolčne soli	8,0 g
saharoza	20,0 g
bromtimol modro	0,04 g
timol modro	0,04 g
agar	8,0 –18,0 g (odvisno od želirnih lastnosti)
destilirana voda	1000 ml

pH: 8,6

b) Dodatno smo 1 ml homogenata iz prebavnih žlez prelili z obogatitvenim gojiščem − alkalno slana peptonska voda APW (*angl. alkaline peptone water*) − v razmerju 1:9 ter inkubirali pri 37 °C ± 1,0 °C 6 ur in nato še nadaljnjih 18 ur. Po šestih urah inkubacije smo vzorce s cepilno zanko nasadili na agar TCBS, enako smo ponovili po 18 urah inkubacije. Bujon smo še dodatno razredčili ter na TCBS cepili redčitve od 10^{-2} do 10^{-8}.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili sev *V. parahaemolyticus* 2346 (pridobljen v »Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science«; CEFAS, Weymouth, Velika Britanija).
Po končani inkubaciji smo vse plošče pregledali na prisotnost tipičnih kolonij.

Gojišče APW smo pripravili tako, da smo 20,0 g peptona (Biolife) in 30,0 g natrijevega klorida (Merck) raztopili v 1000 ml vode, raztopino umerili na pH 8,6 ter sterilizirali z avtoklaviranjem (avtoklav A-63 CVH, Kambič) pri 121 °C 15 minut. Do uporabe smo jo hranili pri 4 °C.

3.3.2 Biokemijska potrditev

Značilne kolonije smo precepili na slani hranilni agar SNA (*angl. saline nutrient agar*) in inkubirali 24 ur pri 37 °C ± 1,0. Po inkubaciji smo opravili oksidazni test ter v primeru pozitivnega rezultata še biokemijske teste z uporabo testa API 20E (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, Francija).

Gojišče SNA s 3 % natrijevega klorida smo pripravili tako, da smo 5,0 g peptona (Biolife, Italija), 3,0 g mesnega ekstrakta (Biolife, Italija), 30,0 g natrijevega klorida (Merck, Nemčija) in 8,0−18,0 g (odvisno od želirnih lastnosti) raztopili v 1000 ml vode, umerili pH na 8,5, segrevali do vrenja in sterilizirali v avtoklavu (avtoklav A-63 CVH, Kambič) 15 minut pri 121 °C. Petnajst mililitrov ohlajenega gojišča na 45 °C smo razlili v sterilne petrijevke in pustili, da so se posušile. Do uporabe smo jih hranili pri 4 °C.

3.3.3 Ugotavljanje *V. parahaemolyticus* iz kolonij, izoliranih na agarju TCBS, in iz obogatitvenega gojišča z molekularno metodo

− Izolacija DNA iz bakterijske kolonije

Z 10 µl sterilno bakteriološko zanko smo zajeli bakterijsko kolonijo in jo zmešali s 100 µl H_2O (DEPC). Suspenzijo celic v epruvetki smo pustili v vodni kopeli vreti 10 minut, da se je iz celic sprostila DNA. Epruvetke smo takoj prenesli za 5 minut na led, jih premešali na vibratorskem mešalu in centrifugirali 15 minut pri 10.000 *g*. Izolirano DNA smo do testiranja hranili pri temperaturi −20 °C.

− Izolacija DNA iz obogatitvenega gojišča

Iz obogatitvenega bujona smo tik pod površino gojišča odvzeli 1 ml vzorca ter ga prenesli v 1,5 ml epruvetko in centrifugirali 1 minuto pri 2.000 rpm, da smo odstranili večje delce.

Od tako dobljenega supernatanta smo prenesli 0,1 ml v novo epruvetko in 10 minut segrevali na 100 °C v vodni kopeli, nato pustili 5 minut na ledu in premešali z vibratorskim mešalom. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 4 °C in 10.000 g. Supernatante, ki so vsebovali DNA, smo prenesli v nove 1,5 ml epruvetke in do uporabe v verižni reakciji s polimerazo shranili na –20 °C.

− Verižna reakcija s polimerazo

Z verižno reakcijo s polimerazo smo ugotavljali prisotnost genov *toxR* in *tlh*. Vzorce, ki so bili pozitivni na omenjena gena, smo preiskali še na prisotnost genov za hemolizina *tdh* in *trh*. Verižno reakcijo s polimerazo smo izvajali v termopomnoževalniku (T3, BIOMETRA, Nemčija). Reakcijske mešanice so vsebovale 10X PCR pufer, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP, 20 pmolov začetnih oligonukleotidov F in R (tabela 6), 2 U Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, ZDA). Za pomnoževanje smo v 50 µl reakcijskih mešanicah uporabili 5 µl izolirane DNA.

Parameteri za pomnoževanje so bili naslednji:

Potek pomnoževanja gena *toxR*:

- razdvajanje: 2 minuti pri 94 °C,
- 35 ciklov: 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 60 °C, 60 sekund pri 72 °C,
- podaljševanje: 7 minut pri 72 °C.

Potek pomnoževanja gena *tlh*:

- razdvajanje: 3 minute pri 94 °C,
- 35 ciklov: 60 sekund pri 94 °C, 60 sekund pri 58 °C, 60 sekund pri 72 °C,
- podaljševanje: 5 minut pri 72 °C.

Potek pomnoževanja genov *trh* in *tdh*:

- razdvajanje: 2 minuti pri 94 °C,
- 35 ciklov: 30 sekund pri 94 °C, 30 sekund pri 55 °C, 60 sekund pri 72 °C,
- podaljševanje: 7 minut pri 72 °C.

Velikost pomnožkov smo preverili z elektroforezo v 1,8 % agaroznem gelu (Sigma-Aldrich, ZDA), ki je vseboval 0,5 µg/ml etidijevega bromida pod UV-transiluminatorjem in primerjali z markerjem velikosti 100-bp (Fermentas, Nemčija).

Tabela 6: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje genov *V. parahaemolyticus.*

Tarčni gen in ime začetnih oligonukleotidov	Nukleotidno zaporedje (5'–3')	Velikost produkta (bp)	Reference
toxR – F	GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG	368	Kim in sod., 1999
toxR – R	ATA CGA GTG GT GCT GTC ATG		
tlh – L	AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG	450	Taniguchi in sod., 1985, 1986
tlh – R	GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC		
trh – F	GGC TCA AAA TGG TTA AGC G	251	Bej in sod., 1999
trh – R	CAT TTC CGC TCT CAT ATG C		
tdh – F	CCA CTA CCA CTC ATA TGC	251	Bej in sod., 1999
tdh – R	GGT ACT AAT GGC TGA CAT C		

3.3.4 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) produktov verižne reakcije s polimerazo

Produkt velikosti 368 bp (gen *toxR*) smo izrezali iz gela in izolirali s komercialnim paketom QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca ter ga uporabili v sekvenčnih reakcijah. Sekvenčne reakcije so bile narejene z ABI Big-dye 3.1 na genetskem analizatorju ABI Prism 3100 Genetic analyser (Applied Biosystems). Dobljene podatke smo obdelali s programom DNASTAR in jih tudi preverili. Sorodnosti med dobljenimi sekvencami in bazo objavljenih podatkov smo obdelali s programom BLAST (*angl. Basic Local Alignment Search Tool*) in banko podatkov NCBI (*angl. National Center for Biotechnology Information*) (http://www.//ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

3.4 Preiskava na prisotnost verotoksične bakterije *E. coli*

Za preiskavo smo uporabili 25 g celotne vsebine klapavic, kar je predstavljalo približno 6−8 školjk.

Petindvajset gramov celotne vsebine školjk smo prelili z 225 ml modificiranega gojišča tripton soja bujon m-TSB (*angl. Triptic Soy Broth Modified*, Biolife, Italija), ki smo mu pred uporabo dodali antibiotik novobiocin v koncentraciji 20 mg/l (1 steklenička v 500 ml m-TSB), vzorec homogenizirali in inkubirali 16−20 ur pri 37 °C. Sestavine gojišča m-TSB so navedene v tabeli 7.

Tabela 7: Sestava gojišča m-TSB

pankreatični izvleček kazeina	17,0 g
sojin pepton	3,0 g
natrijev klorid	5,0 g
dinatrijev hidrogenfosfat	2,5 g
glukoza	2,5 g
žolčne soli št. 3	1,5 g

pH: 7,3

Že pripravljeno komercialno gojišče smo raztopili v vodi, umerili pH in sterilizirali z avtoklaviranjem (avtoklav A-63 CVH, Kambič) 15 minut pri 121 °C. Do uporabe smo jo hranili pri 4 °C.

3.4.1 Ugotavljanje verotoksinov

Preiskavo smo izvedli z uporabo komercialnega encimsko imunskega testa Verotoxin, proizvajalca Ridascreen (R-Biopharm, Nemčija). Test je namenjen ugotavljanju verotoksinov VT 1 in VT 2.

Komercialni test vsebuje:

- mikrotitrsko ploščo, na katero so vezana protitelesa,
- pozitivno kontrolo, pripravljeno za uporabo,
- redčitveni pufer, ki smo ga po navodilih proizvajalca 10-krat redčili,
- konjugat,
- mešanico substrata in kromogena,

- raztopino za zaustavitev reakcije.

Za negativno kontrolo smo uporabili 100 µl gojišča m-TSB.

Pred izvedbo testiranja vzorcev školjk smo metodo ugotavljanja verotoksinov z uporabo komercialnega testa Verotoxin validirali.

Za validacijo postopka ELISA Verotoxin smo pripravili 7 vzorcev školjk:

Kontaminirali smo jih po naslednji shemi:

- 100 CFU *E. coli* (D 08), ki izdeluje verotoksin 2,
- 12 CFU *E. coli* (D 08), ki izdeluje verotoksin 2,
- 100 CFU *E. coli* (A 08), ki izdeluje verotoksin 1,
- 12 CFU *E. coli* (A 08), ki izdeluje verotoksin 1,
- 270 CFU *Pseudomonas aeruginosa* in 10 CFU *E. coli* (D 08), ki izdeluje verotoksin 2,
- kontrolni vzorec (brez kontaminacije).

Vzorce smo testirali neposredno po pripravi ter ponovno po 10-dnevnem zamrzovanju pri −70 °C.

Vzorce za validacijo smo pripravili tako, da smo školjkam, ki preverjeno niso vsebovale verotoksinov, dodali seve verotoksigene *E. coli* v dveh koncentracijskih nivojih. Z namenom preverjanja vpliva vzporedne mikroflore na občutljivost testa smo enemu vzorcu poleg verotoksigenega seva *E. coli* dodali še bakterijski sev *Pseudomonas aeruginosa,* ki je v živilih pogosto prisoten mikrob.

Vzorce smo po inkubaciji v obogatitvenem gojišču m-TSB odpipetirali v sterilne epruvetke in jih centrifugirali 10 minut pri 10.000 obratih. Za testiranje smo uporabili 100 µl vzorca, ki smo ga nanesli v jamice mikrotitrske ploščice. Če so toksini v preiskovanem vzorcu prisotni, se vežejo na protitelesa za VT1 in VT2, ki pokrivajo dno jamic. Dodani encimski konjugat zazna vezani verotoksin in se po dodatku substrata in kromogena spremeni v modro barvo. Reakcijo smo zaustavili z raztopino za zaustavitev. Intenzivnost rumene barve, ki je sorazmerna s koncentracijo verotoksina v vzorcu, smo spektrofotometrično ovrednotili in preračunali po navodilih proizvajalca.

3.4.2 Ugotavljanje prisotnosti verotoksične *E. coli* po ISO 16654:2001

Reagenti in gojišča:

- oksidaza reagent,
- pufer za spiranje (PBS-Tween – pH 7,2).

Pufer za spiranje PBS-Tween smo pripravili tako, da smo v 850 ml destilirane vode raztopili 8,15 g natrijevega klorida, 116 ml raztopine dinatrijevega hidrogen fosfata (Merck, tabela 8), 34 ml raztopine kalijevega dihidrogen fosfata (Merck, tabela 8) in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Raztopini smo dodali 0,5 ml Tween 20 (Merck). Hranili smo jo v temnem prostoru pri temperaturi 1–8 °C največ dva meseca.

Tabela 8: Sestavine PBS-Tween.

dinatrijev hidrogen fosfat	11,876 g v 1000 ml destilirane vode
kalijev dihidrogen fosfat	9,078 g v 1000 ml destilirane vode
natrijev klorid	8,15 g
Tween 20	0,5 ml

Preiskavo smo izvedli skladno z ISO 16654:2001. Preiskava je potekala v več stopnjah:

- Obogatitev v gojišču m-TSB.
- Separacija in koncentracija.
- Izolacija na selektivnih gojiščih SMAC (*angl. Sorbitol Mac Conkey agar*) in CT-SMAC.
- Potrditev.

Najprej smo 25 g vzorca homogenizirali v devetkratni količini obogatitvenega bujona m-TSB, ki smo mu predhodno dodali novobiocin, ter vzorec inkubirali 6 ur pri 41,5 ± 1 °C in nato še nadaljnjih 12−18 ur.

Za kontrolo postopka smo izvajali preiskavo pozitivnega vzorca, ki je vseboval do 50 cfu netoksigenega seva *E. coli* O157 (RDK 067), in vzorca s sevom *E. coli*, ki ni bil sev O157.

Po 6 urah in nato še po 12−18 urah smo izvedli imunoseparacijo. To je ločevanje in koncentriranje *E. coli* O157 s pomočjo imunomagnetnih kroglic Dynabeads anti *E. coli* O157 (Dynal®, ZDA), na katere so vezana protitelesa proti *E. coli* O157.

Dvajset µl suspenzije, ki je vsebovala imunomagnetne kroglice, smo prenesli v epruvetke in dodali en mililiter vzorca po obogatitvi. Epruvetko smo zaprli, postavili na stojalo in inkubirali deset minut. Med inkubacijo smo nekajkrat nežno premešali, da se kroglice niso usedle na dno. V stojalo smo vstavili magnetno ploščo in celotno stojalo večkrat obrnili, da so se kroglice skoncentrirale na magnetnem delu. Po treh minutah smo epruvetke odprli in previdno odpipetirali vso tekočino. Dodali smo 1 mililiter pufra PBS-Tween, zaprli in nekajkrat nežno obrnili stojalo, da so se kroglice premešale ter skoncentrirale na magnetnem delu. Tekoči del smo nato odpipetirali. Spiranje kroglic smo še dvakrat ponovili. Po tretjem spiranju smo kroglicam dodali 100 µl pufra PBS-Tween, premešali in celotno vsebino (po 50 µl) nasadili na gojišči SMAC (Oxoid, Velika Britanija) in CT-SMAC.

Pufer za spiranje, PBS-Tween (sestavine so navedene v tabeli 9), smo pripravili tako, da smo v 850 ml destilirane vode raztopili 8,15 g natrijevega klorida, 116 ml raztopine dinatrijevega hidrogen fosfata in 34 ml raztopine kalijevega dihidrogen fosfata, umerili pH na 7,2 in sterilizirali 15 minut pri 121 °C. Raztopino smo hranili največ dva meseca v temnem prostoru in pri temperaturi 1–8 °C.

Tabela 9: Sestava pufra za spiranje (PBS-Tween).

dinatrijev hidrogen fosfat	11,876 g v 1000 ml destilirane vode
kalijev dihidrogen fosfat	9,078 g v 1000 ml destilirane vode
natrijev klorid	8,15 g
Tween 20	0,5 ml

pH: 7,2

Gojišče SMAC smo pripravili tako, da smo raztopili 51,5 g dehidriranega gojišča v vodi (sestavine so navedene v tabeli 10) in segrevali do vrenja ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

Tabela 10: Sestava gojišča SMAC.

Pepton	20,0 g
Sorbitol	10,0 g
žolčne soli št. 3	1,5 g
natrijev klorid	5,0 g
nevtralno rdeče	0,03 g
kristalno vijolično	0,001 g
agar	15,0 g

pH: 7,1

Steriliziranemu gojišču SMAC, ki smo ga ohladili na 50 °C, smo dodali dva dodatka Cefixime Tellurite − CT (Oxoid), ki sta vsebovala 2,5 g natrijevega telurita in 0,05 g cefiksima. Dodatka smo raztopili v 2 ml sterilne destilirane vode, dobro premešali z gojiščem in razlili v petrijevke. Hranili smo jih največ 14 dni pri 4 °C.

Plošče smo inkubirali pri 37 °C ± 1 °C od 18 do 24 ur in jih po inkubaciji pregledali na prisotnost značilnih kolonij.

Prosojne in brezbarvne kolonije ter kolonije z bledo rumenorjavim centrom s premerom 1 mm smo ocenili za sumljive. Le-te smo biokemijsko potrjevali s testom na proizvodnjo indola tako, da smo z bakteriološko zanko kulturo vtrli na filter papir, na katerega smo predhodno kanili kapljico reagenta indol (Difco ™,&BBL™, ZDA). Reakcija je bila pozitivna, če se je v 10–30 sekundah pojavila turkizna barvna reakcija.

Kolonije, ki so reagirale pozitivno na indol, smo serološko potrjevali še z aglutinacijskim testom z lateksom (*E. coli* O157 Latex Test, Oxoid, Velika Britanija).

3.5 Ugotavljanje norovirusov

3.5.1 Izolacija celokupne RNA

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali različne metode za izolacijo RNA. Uporabili smo komercialna paketa PureLink™ Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen, ZDA) in RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija).

Pri uporabi komercialnega paketa PureLink™ Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen, ZDA) smo uporabili postopek, ki ga navaja proizvajalec tega paketa, in tudi delno modifikacijo tega postopka.

Uspešnost izolacije smo ugotavljali s pomnoževanjem tarčne sekvence v odseku genoma med ORF1 in ORF2 z metodo RT-PCR v realnem času.

Za ugotavljanje stopnje inhibicije smo vzorcem dodali znano koncentracijo luciferazne molekule (luc-RNA). Stopnjo inhibicije smo ugotavljali s primerjavo vrednosti Ct, ki smo jih dobili v postopku RT-PCR v realnem času.

− Izolacija s komercialnim paketom PureLink™ Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen, ZDA)

Raztopina za lizo celic, ki je vsebovala gvanidinijev izotiocianat, je denaturirala proteine in inaktivirala ribonukleazno aktivnost RNaz. Vzorec, ki smo mu dodali raztopino za lizo, smo nanesli na membrano kolone, kamor sta se celokupna RNA in DNA vezali, preostale snovi smo s spiralnimi raztopinami sprali z membrane kolonic.

A Opis postopka po navodilih proizvajalca

− Predpriprava reagentov:

Liofilizirano nosilno RNA smo raztopili v H_2O-DEPC in dobili raztopino nosilne RNA s končno koncentracijo 1 µg/µl. Razdelili smo jo v alikvote po 50 µl in jo do uporabe shranili pri –20 °C.

Količino pripravljene raztopine, ki smo jo dodali raztopini za lizo, smo glede na število vzorcev preračunali po naslednji formuli:

N x 0,21 ml (volumen raztopine za lizo) = A ml

A ml x 28 µl /ml = B µl

Legenda:

N = število vzorcev

A = izračunan volumen raztopine za lizo

B = preračunan volumen založne raztopine nosilne RNA (1 µg/µl), ki jo moramo dodati raztopini za lizo.

Za vsak vzorec smo uporabili 5,6 µg nosilne raztopine RNA in 200 µl raztopine za lizo.

− Priprava lizata:

Odpipetirali smo 25 µl proteinaze K, 200 µl vzorca in 200 µl pripravljenje raztopine nosilne RNA v epruvetko in mešali 15 s na vibratorskem mešalu.

Po inkubaciji pri 56 °C za 15 minut smo epruvetko centrifugirali kratek čas, da smo odstranili kapljice na pokrovu.

− Vezava in spiranje:

Vsebini epruvetke smo dodali še 250 µl absolutnega etanola, premešali na vibratorskem mešalu, pustili 5 minut na sobni temperaturi ter centrifugirali, da smo odstranili kapljice na pokrovu.

Vsebino smo prenesli na membrano kolone in centrifugirali eno minuto pri 6.800 g. Pretočno vsebino na dnu zbiralne epruvetke smo zavrgli.

Kolonico smo še dvakrat sprali s 500 µL spiralnega pufra »washing solution« in centrifugirali pri 6.800 g.

S tretjim centrifugiranjem (1 minuto pri 18.000 g) smo odstranili ostanke pufrov.

Vezano nukleinsko kislino na kolonici smo sprali s 50 µl (2 x 25) H_2O-DEPC. Do uporabe v RT-PCR in RT-PCR v realnem času smo jo hranili v zamrzovalniku na −75 °C.

B Modificirana metoda

Pri izolaciji s PureLink™ Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen, ZDA) smo poskusili še modificirano metodo, pri kateri smo vzorec najprej prečistili s trizolom in kloroformom ter nato še z epruvetkami z ločevalnim gelom (MaxTract High Density tubes, Qiagen, Nemčija).

− Priprava:

V 800 µl trizola smo dodali 200 µl pripravljenega vzorca (opisan v točki 3.2.3) in v 1,5 ml epruvetki premešali s pipetiranjem. Pet minut smo pustili na sobni temperaturi. Dodali smo

160 µl kloroforma in premešali s pipetiranjem. Celotno vsebino smo prenesli v 2 ml epruvetke "MaxTract High density tubes" in inkubirali na sobni temperaturi 5−10 minut.
Epruvetke smo centrifugirali 10 minut pri 4 ºC in 13.000 rpm, tako da je gel ločil zgornjo vodno od spodnje organske faze. Zgornjo fazo, ki je vsebovala RNA, smo prenesli v nove 1,5 ml epruvetke in dodali nosilno RNA, redčeno po proizvajalčevih navodilih (opisano v točki 3.5.1 A), ter pustili 5 minut na sobni temperaturi.
Dodali smo 300 µl 75 % etanola in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Celotno vsebino smo dodali na membrano kolone v dveh korakih in centrifugirali 1 minuto pri 6.800 g.
Kolonico smo dvakrat sprali s 500 µl raztopine za spiranje »washing solution « in centrifugirali pri 6.800 g. S tretjim centrifugiranjem (1 minuto pri 18.000 g) smo odstranili ostanke pufrov. Vezane nukleinske kisline na membrani kolone smo sprali s 50 µl (2 x 25) H_2O-DEPC. Do uporabe v RT-PCR in RT-PCR v realnem času smo jo hranili v zamrzovalniku pri −75 °C.
Za pozitivno kontrolo smo uporabili seve norovirusov. Prejeli smo jih iz Evropskega referenčnega laboratorija za virusno kontaminacijo (Cefas, Weymouth, Velika Britanija) v sklopu medlaboratorijskega preverjanja − PT (*angl. proficiency testing*) (tabela 11). Vzorce smo do obdelave hranili pri −75 °C.

Tabela 11: Pregled referenčnih sevov norovirusov in virusa hepatitisa A, ki smo jih uporabili kot pozitivne kontrole (vir: Poročilo referenčnega laboratorija za bakterijsko in virusno kontaminacijo 2008 − RT 27 norovirus/hepatitis A).

Vzorec	Vir	*Podatki o sekvenci*
Norovirus genetske skupine I	blato	GI.4; sekvenca je v 96,2 % homologna s sevom Chiba virus (AB022679)
Norovirus genetske skupine II	blato	GII.4; sekvenca je v 99,7 % homologna s sevom Isumi (AB295790)
Virus hepatitisa A	laboratorijski referenčni sev	sev HM175/43c

− Izolacija s komercialnim paketom RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija)

Reagenti, ki so v kompletu:

• lizirajoči pufer z gvanidijevim izotiocianatom (pufer RLT in pufer RW1),

• pufer z dodanim absolutnim etanolom (pufer RPE).

Izolacijo celokupne RNA smo izvajali po navodilih proizvajalca.

Dvajset µl predhodno pripravljenih vzorcev (opisano v točki 3.2.3) smo dodali v 400 µl raztopine za lizo (pufer RTL). Z dodatkom gvanidinijevega izotiocianata smo v vzorcu denaturirali beljakovine in ribonukleazne encime ter tako izolirali celokupne nukleinske kisline. S centrifugiranjem skozi dodatno kolonico (*gDNA eliminator*) smo odstranili genomsko DNA ter tako v zbirni epruvetki izolirali celokupno RNA. Dodali smo ji raztopino z dodanim etanolom (pufer RPE), ki je omogočil vezavo RNA na membrano kolone. S centrifugiranjem smo preostanek vzorca sprali, RNA je ostala vezana na kolonico. Postopek centrifugiranja smo še dvakrat ponovili s pufrom RPE. RNA smo sprali v 80 µl H2O-DEPC. Do uporabe v RT-PCR in RT-PCR v realnem času smo jo hranili v zamrzovalniku na −75 °C.

3.5.2 Merjenje koncentracije nukleinskih kislin (izoliranih z opisanimi komercialnimi paketi)

– Spektrofotometrično

Koncentracijo izoliranih nukleinskih kislin smo preverili spektrofotometrično z LAMBDA BIO + (PerkinElmer, ZDA). S spektrofotometrom smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 230, 260 in 280 nm in tudi razmerje med A260/A280, A260/A230.

– Fluorometrično

Z napravo QUBIT (Invitrogen, ZDA) smo merili izolirane nukleinske kisline fluorometrično.

V reakciji se nukleinske kisline v vzorcu vežejo s posebnimi reagenti, aparat zazna fluorescenco in jo, glede na količino uporabljenega vzorca, preračuna.

− Za ugotavljanje koncentracije RNA smo uporabili test Quant-iT™ RNA Assay Kit (Invitrogen, ZDA). Vzorec smo redčili s pripravljenim pufrom in reagentom v razmerju, da je bila koncentracija RNA v vzorcih v območju 250 pg/µl do 100 ng/µl.

− Za ugotavljanje koncentracije DNA smo uporabili test Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, ZDA), vzorec redčili, da so bile izmerjene vrednosti DNA v vzorcu znotraj območja 10 pg/µl do 100 ng/µl.

3.5.3 Metoda reverzne transkripcije s sledečo verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (*angl. real time RT-PCR*)

Za pomnoževanje odseka v odseku genoma med ORF1 in ORF2 smo uporabili komplet kemikalij SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR System with ROX, (Invitrogen™, ZDA), ki omogoča pomnoževanje v eni stopnji.

Za vsak vzorec smo pripravili 21 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 12,5 µl reakcijske mešanice s pasivnim referenčnim barvilom ROX, 0,5 µl mešanice encimov reverzne transkriptaze Superscript™ III RT in Platinum® *Taq* polimeraze DNA, 0,5 µl 200 nM sonde, 1,0 µl 200 nM posameznega začetnega oligonukleotida in 5,5 µl H_2O-DEPC, ki smo jo nanesli v jamice na optični ploščici (96-Well Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, ZDA) in v vsako reakcijo pomnoževanja dodali po 4 µl izolirane RNA. Vsak vzorec smo na ploščico nanesli v dveh ponovitvah. V zadnji reakcijski mešanici smo dodali 4 µl H_2O-DEPC in je služila kot kontrola kontaminacije (NTC, *angl. no template control*). Ploščico smo prekrili z optično folijo, centrifugirali v centrifugi Multifuge 1 S-R (Heraeus, Nemčija) 5 minut pri 4300 cfu in 4 °C in vstavili v aparaturo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA), v kateri je potekala reakcija pomnoževanja v realnem času.

Za spremljanje uspešnosti postopka izolacije RNA in ugotavljanja prisotnosti inhibitornih substanc v izolirani RNA smo vzorcem dodali luc-RNA. Pomnoževanje kontrolne luc-RNA smo izvajali hkrati s cDNA, z začetnimi oligonukleotidi LUC-F/LUC-R in sondo z vezanim fluoroforom YY (*angl. Yakima yellow*) in neflourescentnim dušilcem BHQ (*angl. Black hole quencher*). Kontrolno luc-RNA smo dodali vzorcem školjk kot tudi negativni kontroli (H_2O-DEPC).

Z metodo RT-PCR v realnem času smo virusno nukleinsko kislino pomnoževali s smiselnim začetnim oligonukleotidom COG1-F (Kageyama in sod., 2003) in protismiselnim začetnim oligonukleotidom COG1-R ter sondo RING1 (Kageyama in sod., 2003, tabela 12) za ugotavljanje norovirusov iz genske skupine I ter s smiselnim začetnim oligonukleotidom COG2-F (Kageyama in sod., 2003) in protismiselnim začetnim oligonukleotidom COG2-R ter sondo RING 2-TP (Kageyama in sod., 2003, tabela 12) za ugotavljanje norovirusov iz genske skupine II. Pri dokazovanju norovirusov genske skupine I smo pomnoževali odsek dolžine 85 bp, pri norovirusih iz genske skupine II pa 98 bp.

Za dokaz virusne RNA smo uporabili detekcijski sistem, ki temelji na sondi TaqMan.
Sondi RING1 in RING2 sta na 5' koncu označeni s fluorescentnim barvilom FAM (6-karboksifluorescein), na 3' koncu pa imata dušilno barvilo (NFQ, *angl. non-fluorescent quencher*), in sicer RING1: BBQ (*angl. Black Berry Quencher*), RING2 pa BHQ (*angl. Black Hole Quencher*). Mesta prileganja začetnih oligonukleotidov smo izbrali v odseku, kjer se stikata nestrukturni (ORF1) in strukturni (ORF2) gen, ki je najbolj ohranjen del norovirusnega genoma (Katayama in sod., 2002).

– Obdelava rezultatov

Rezultate smo analizirali s programom SDS, verzija 1.1 (Applied Biosystems, ZDA).
Fluorescenca reporterske molekule je po reakciji normalizirana glede na fluorescenco ozadja aparature, glede na interno pasivno referenčno barvilo ROX, ki je v reakcijski mešanici in glede na bazno linijo. Normaliziran fluorescenčni signal je podan kot vrednost Rn.
Program izriše graf pomnoževanja produkta PCR. Na osi x je podano število ciklov (1−45), na osi y pa vrednost Rn. Linija praga reakcije (*angl. treshold*), ki jo določimo v eksponentnem delu logaritemske krivulje, določa število ciklov (vrednost Ct), pri katerem fluorescenčni signal, ki ga povzroči vzorec, preseže linijo praga reakcije. Pri večjem številu molekul DNA v vzorcu fluorescenčni signal prej preseže prag reakcije, kar vidimo z manjšo vrednostjo Ct. Vrednosti Ct so tako obratno sorazmerne s količino tarčnih molekul in na osnovi le-teh smo vzorce med seboj primerjali.
Pri določevanju vrednosti Ct (*angl. cycle treshold*) smo največkrat upoštevali avtomatsko nastavitev vrednosti bazne linije in praga reakcije na 0,2000.

Ko je količina virusne RNA v vzorcu zelo majhna in je krivulja posledično bolj položna, smo linijo praga reakcije nastavili ročno v začetni fazi eksponentnega omnoževanja.

Vrednosti Ct smo prenesli v program Microsoft Excel. Iz dveh ponovitev istega vzorca smo izračunali povprečno vrednost Ct.

Rezultate smo interpretirali na naslednji način:

- vzorce, katerih vrednost Ct je bila manjša ali enaka 40, smo določili za pozitivne,
- vzorce, katerih vrednost Ct je bila večja ali enaka 40, smo določili za negativne.

Program je potekal na naslednji način:

Petnajst minut je pri 50 °C potekal reverzni prepis RNA v komplementarno DNA.

Sledilo je 2-minutno segrevanje pri 95 °C, kar je inaktiviralo reverzno transkriptazo in razgradnjo dvojnovijačnic RNA-cDNA. V 45 temperaturnih ciklih se je zvrstilo:

- denaturacija cDNA: 15 sekund pri 95 °C,
- prileganje začetnih oligonukleotidov: 45 sekund pri 56 °C.

Tabela 12: Začetni oligonukleotidi in lovke za ugotavljanje norovirusov z RT-PCR v realnem času.

Začetni oligonukleotidi in lovki	Nukleotidno zaporedje	Mesto prileganja v genomu	Vir
COG1-F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291-5310	Kageyama in sod., 2003
COG1-R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5354–5375	
RING1	5'-FAM-AGATYGCGRTCYCCTGTCCA-BBQ-3'	5321-5340	
COG2-F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGATGAG	5003-5028	Kageyama in sod., 2003
COG2-R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	5080–5100	
RING2-TP	5'-FAM- TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-BHQ-3'	5048-5067	

3.5.4 Metoda reverzne transkripcije s sledečo verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) ali klasična RT-PCR

SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® (Invitrogen)

Reagenti:

• 2-krat reakcijska mešanica (0,4 mM vsakega od dNTP, 2,4 mM $MgSO_4$),

• mešanica encimov SuperScript™ II reverzna transkriptaza in Platinum® *Taq* polimeraza DNA.

Za delno pomnoževanje virusnega genoma smo izbrali začetne oligonukleotide, ki so za človeške noroviruse skupinsko značilni in pomnožujejo 326 bp dolg odsek za od RNA odvisno polimerazo RNA (RdRp) (Vennema in sod., 2002).

Začetne oligonukleotide JV12Y/JV13I smo uporabili za dokazovanje polimeraznega dela norovirusnega genoma obeh genskih skupin (tabela 13).

Z oligonukleotidnimi začetniki G1SKF/G1SKR (Kojima in sod., 2002) smo dokazovali kapsidni del genske skupine GI, z G2SKF/G2SKR (Kojima in sod., 2002) pa kapsidni del GII (tabela 13).

Tabela 13: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje norovirusov z RT-PCR in njihove značilnosti.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'–3'	Mesto v genomu	Tarčna genetska skupina	Tarčni del in dolžina produkta	Vir
G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	5342 - 5361	GI	Kapsida 329 bp	Kojima in sod., 2002
G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	5653 - 5671	GI		
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5058 – 5076	GII	Kapsida 343 bp	Kojima in sod., 2002
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	5379 - 5401	GII		
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 - 4572	GI	RdRp 327 bp	Vennema in sod., 2002
		4279 - 4299	GII		
JV13I	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 - 4878	GI		
		4585 - 4605	GII		

Začetni oligonukleotidi

- **JV12Y/JV13I** pomnožujejo odsek gena za od RNA odvisno polimerazo RNA (RdRp) na ORF1 norovirusov.
- **G1SKF/G1SKR** pomnožujejo kapsidni odsek na ORF2 norovirusov genske skupine GI.
- **G2SKF/G2SKR** pomnožujejo kapsidni odsek na ORF2 norovirusov genske skupine GII.

Program za RT-PCR je potekal v naslednjih stopnjah:
Petinštirideset minut je pri 45 °C potekal reverzni prepis RNA v komplementarno DNA. Sledilo je 2-minutno segrevanje pri 94 °C za inaktivacijo reverzne transkriptaze in razgradnjo dvojnovijačnic RNA-cDNA. V 50 temperaturnih ciklih se je zvrstilo:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C,
- prileganje začetnih oligonukleotidov: 1 minuto pri 40 °C z JV12Y/JV13I,
- oziroma 1 minuta pri 48°C z G1SKF/G1SKR ter G2SKF/G2SKR,
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 2 minuti pri 68 °C.

Cikli so se zaključili s 7-minutnim končnim podaljševanjem pri 68 °C in ohlajanjem reakcijske mešanice na 4 °C.

Reakcije RT-PCR so potekale v termopomnoževalniku (T3, BIOMETRA, Nemčija). Reakcijske mešanice so vsebovale: 0.4 mM dNTP, 3.2 mM MgSO4, 1 µl 20 pmol začetnih oligonukleotidov (tabela 13), 1 µl encima SuperScript® III RT/ Platinum® *Taq* Mix (Invitrogen™ , ZDA). Za pomnoževanje smo v 50 µl reakcijskih mešanicah uporabili 4 µl izolirane RNA.

3.5.5 Elektroforeza v agaroznem gelu

Pufri in reagenti:

- 6-kratni nanašalni pufer,
- bromfenol modro 0,25 %,
- ksilen cianol 0,25 %,
- saharoza v 5 mM EDTA 40 %.

• Označevalec DNA (GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas).

• TAE pufer (delovna raztopina) pripravimo iz 50-kratnega TAE (založna raztopina):

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

EDTA in bazo Tris smo zmešali, do 850 ml dodali destilirano H_2O in mešali, dokler se reagenta nista raztopila. Dodali smo ocetno kislino in uravnali pH na 8,5 ter dopolnili z destilirano H2O do 1000 ml.

Etidijev bromid (0,5 µl/ml) delovna raztopina:

- 3 kapljice etidijevaga v 450 ml 1x TAE pufra.

Agarozni gel:

- 1,8 g agaroze,
- 100 ml 1x TAE.

V erlenmajerico smo zatehtali agarozo, dolili pufer 1x TAE in segrevali do vrenja ter vmes večkrat premešali. Postopek smo ponavljali, dokler se agaroza ni povsem raztopila in postala bistra. Ohlajeno na približno 50 °C smo vlili v kadičko, vstavili model za žepke in počakali, da se je strdila. Model smo odstranili, vstavili v aparaturo za elektroforezo in v žepke nanesli vzorce.

Petnajst µl produkta smo premešali s tremi µl nanašalne raztopine in prenesli v žepke. Za kontrolo velikosti produktov smo uporabili 3 µl standarda DNA velikosti 100 bp, ki smo ga zmešali s 3 µl nanašalne raztopine. Kadičko smo priključili na električno napetost in elektroforezo pustili teči približno eno uro.

Po končali elektroforezi smo gel analizirali z UV-presvetljevalcem, sliko posneli s kamero in ga z računalniškim programom dokumentirali.

3.5.6 Določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) produktov verižne reakcije s polimerazo

− Čiščenje produktov

Specifične produkte RT-PCR smo očistili s komercialnim kompletom E-Gel® SizeSelect™ gels E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen™, ZDA) po proizvajalčevih navodilih.

Opis postopka

Gel ima na vrhnjem delu 9 žepkov (8 vzorcev in žepek za standard), v katere nanesemo produkte, ki smo jih predhodno zmešali s H_2O (DEPC) v razmerju 1:1. Če je intenzivnost signalov pri presvetljevanju zelo šibka, v mešanico dodamo več produkta in manj vode. Istočasno dodamo v žepke na spodnjem delu gela 10 µl H_2O (DEPC). Nastavimo na želeni program in pustimo elektroforezo teči. Tekom elektroforeze se produkti ločijo po velikosti, in ko dosežejo želeni žepek na spodnjem delu gela, jih prenesemo v sterilne epruvetke. V gel je vključeno barvilo, ki se veže v dvojnovijačno DNA, potovanje produktov tako lahko spremljamo preko presvetljevalca (E-Gel® Safe Imager™ Real Time Transilluminator). Prečiščene produkte smo uporabili v sekvenčnih reakcijah. Sekvenčne reakcije so bile narejene s sekvenčnim kitom (ABI Big-dye 3.1) po proizvajalčevih navodilih na genetskem analizatorju (ABI Prism 3100 Genetic analyser, Applied Biosystems, ZDA).

− Sekvenciranje odseka za polimerazni del (ORF1) in kapsidni del (ORF2) genoma

Sevom, ki smo jih potrdili v časovnem obdobju od leta 2006 do leta 2008, smo določili nukleotidna zaporedja, jih obdelali s programsko aplikacijo DNASTAR in jih tudi preverili. S programom SeqMan smo sestavili pare zaporedij v eno soglasno zaporedje. Neberljiv začetek in konec smo odrezali, prav tako smo odrezali zaporedje začetnih oligonukleotidov. Poravnano in sestavljeno zaporedje smo preverili vzdolž verige morebitnih neujemanj. Nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki v genski bazi preko medmrežnega servisa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) z bazo NCBI (*angl. National Centre for Biotechnology Information*) (http://www.//ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Zaporedja vseh analiziranih vzorcev smo poravnali, uredili in analizirali medsebojno sorodnost s programom MegAlign. Za primerjalno analizo sekvenc smo z brskalnikom za iskanje po bioloških podatkovnih zbirkah, ki jih ureja Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije (NCBI), dobili podatke o nukleotidnem zaporedju različnih sevov norovirusov (tabele 14, 15 in 16).

Tabela 14: Seznam sevov norovirusov, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF1.

Genska skupina	Oznaka seva	Država izvora	Leto izolacije	V GenBank dostopna številka (*angl. accession number*)
II	Chiba407	Japonska	1987	AB220921
II	Vannes	Francija	2000	AY773210
II	Southampton	Velika Britanija	1993	L07418
II	Toyama3	Japonska	2007	AB541357
II	Shenzhenl	Kitajska	2006	EU794712
II	Fukui5	Japonska	2008	AB541250
II	Seul	Koreja	2008	FJ595922
II	Niigata4	Japonska	2007	AB541315
II	Kumamoto2	Japonska	2007	AB541278
II	Shimane	Japonska	2008	AB541350
II	Miyazaki7	Japonska	2007	AB541298
II	Osaka5	Japonska	2007	AB5412327
II	Hawaii	ZDA	1971	U07611
II	Aomori5	Japonska	2007	AB541227
II	VIC3863	Avstralija	2007	GQ845322
II	Lordsdale	Velika Britanija	1993	X86557
II	PC03	Indija	2006	EU019230
II	VIG-136-PA	Brazilija	2003	GU012319
II	Sapporo	Japonska	2007	GU594164
II	Stockholm	Švedska	2002	AJ626568
I	Desert Shield	ZDA	1993	U04469
I	Norwalk	ZDA	1968	M87661
I	Leuven	Belgija	2003	FJ515294

V primerjalno analizo sekvenc smo vključili tudi druge izolate norovirusov iz področja Slovenije. To so sevi, ki so jih izolirali v obdobju od leta 2005 do leta 2010 iz kliničnih primerov obolelih za gastroenteritisom, ter sevi, izolirani iz površinskih voda, ki so jih opisali Steyer in sodelavci (Steyer in sod., 2011) (tabela 15).

Tabela 15: Seznam sevov norovirusov iz Slovenije, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF1. Z modro barvo so označeni sevi, izolirani iz vode, z rdečo barvo pa klinični izolati.

Genotip	Oznaka seva	Leto izolacije	V GenBank dostopna številka (*angl. accession number*)
II.2	V1/09	2009	JF830562
II.4	V2/09	2009	JF830563
II.4	V3/09	2009	JF830564
II.4	V7/09	2009	JF830565
II.4	V47/09	2009	JF830566
II.4	V17/08	2009	JF830567
II.4	1732/07	2007	JF830568
II.4	1991/07	2007	JF830569
II.4	580/07	2007	JF830570
II.4	290/05	2005	JF830571
II.4	288/05	2005	JF830572
II.4	2791/09	2009	JF830573
II.4	2830/09	2009	JF830574
II.4	2889/09	2009	JF830575
II.4	757/10	2010	JF830576
II.4	756/10	2010	JF830577
II.4	755/10	2010	JF830578
II.4	220/10	2010	JF830579

Tabela 16: Seznam sevov norovirusov, ki smo jih uporabili v filogenetskih analizah delnih nukleotidnih zaporedij za ORF2.

Genska skupina	Oznaka seva	Država izvora	Leto izolacije	V GenBank dostopna številka (*angl. accession number*)
I	Desert Shield	ZDA	1993	U04469
I	Norwalk	ZDA	1968	M87661
I	C2	Singapur	2008	HM209170
I	OC	Japonska	2002	AB545178
I	NSB	Rusija	2009	GU138161
I	Gunma	Japonska	2004	AB246128
I	Stromstad	Švedska	2007	FJ384783
I	Guanxi	Kitajska	2010	HM241691
I	C1	Singapur	2006	FJ788358
I	Delsjo	Švedska	2004	EU085529
I	musselsFoto	Švedska	2004	EU085523
I	wastewater	Japonska	2006	AB597451
I	clamShimane	Japonska	2008	AB522418
I	oysterYamaguchi	Japonska	2005	AB262157
I	clamShijimi	Japonska	2008	EF424516

Sevom, ki smo jih izolirali iz klapavic, smo določili nukleotidna zaporedja in jih predložili genski bazi GenBank (*National Center for Biotechnology Information*) v odobritev. Vsakemu nukleotidnemu zaporedju slovenskega seva norovirusa so podelili kodo (*angl. accession number*), s pomočjo katere lahko pridemo do javno dostopnih podatkov o nukleotidnih zaporedjih. S programom za progresivno poravnavo več zaporedij Clustal W 1.83 (Thompson in sod., 1994) smo jih poravnali z znanimi nukleotidnimi zaporedji iz baze podatkov GenBank. V analizo gena za polimerazo (ORF1) smo vključili 10 sekvenc slovenskih izolatov norovirusov, 23 sekvenc izbranih iz genske baze GenBank (tabela 14) ter 17 sevov iz Slovenije (tabela 15). V analizo gena za kapsidni del norovirusnega genoma pa smo poleg dveh slovenskih vključili tudi 15 nukleotidnih zaporedij, izbranih iz genske baze (tabela 16).
S programom MegAlign (DNASTAR, ZDA) smo določili razlike (*angl. divergence*) in odstotek identičnosti (*angl. percent identity*) med posameznimi pari nukleotidnih zaporedij.

V analizi smo uporabili 281 nukleotidov dolgo poravnavo 27 nukleotidnih zaporedij ORF1. V analizo smo vključili nukleotidna zaporedja desetih izolatov norovirusov, ki smo jih pridobili s pomnoževanjem nukleinske kisline v vzorcih klapavic, ter 17 sevov, ki so jih izolirali Steyer in sodelavci (Steyer in sod., 2011) iz voda v Sloveniji in kliničnih primerov obolelih ljudi. Filogenetsko analizo smo opravili tudi s programom MEGA 4 (Tamura in sod., 2007). Statistično moč izdelanega drevesa in zanesljivost postavljenih vej smo preverili s 1000-kratnimi ponovitvami (*angl. bootstraping*), kar je prikazano v odstotkih (%). V vozliščih so prikazane le vrednosti več kot 50 %.

3.6 Ugotavljanje virusa hepatitisa A

Virus hepatitisa A smo ugotavljali na dva načina: z RT-PCR v realnem času in s klasično metodo RT-PCR.

Izolirano celokupno RNA, ki smo jo izolirali s komercialnima paketoma RNA/DNA Viral ter RNeasy (opisano v točki 3.5.1) smo uporabili tudi za ugotavljanje virusa hepatitisa A.

3.6.1 Metoda RT-PCR v realnem času

Uporabili smo reagente za enostopenjsko reakcijo RT-PCR v realnem času (SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR System with ROX, Invitrogen™, ZDA).

• 2 x reakcijska mešanica, ki vsebuje 6 mM $MgSO_4$, 0,4 mM dNTP in 1 µM barvila ROX,

• mešanica encimov SuperScript™ III reverzna transkriptaza in Platinum® *Taq* polimeraza DNA.

Program je potekal v naslednjih korakih:

Petnajst minut je pri 50 °C potekal reverzni prepis RNA v komplementarno DNA.

Sledilo je 2-minutno segrevanje pri 95 °C za inaktivacijo reverzne transkriptaze in razgradnjo dvojnovijačnic RNA-cDNA. V 45 temperaturnih ciklih se je zvrstilo:

- denaturacija cDNA: 15 sekund pri 95 °C,
- prileganje začetnih oligonukleotidov: 30 sekund pri 60 °C.

Za pomnoževanje 98 bp dolgega odseka kapsidne regije (VP1) smo uporabili komplet kemikalij SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR System with ROX, (Invitrogen™, ZDA), ki omogoča pomnoževanje v eni stopnji.

Za vsak vzorec smo pripravili 21 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala 12,5 µl reakcijske mešanice s pasivnim referenčnim barvilom ROX, 0,5 µl mešanice encimov reverzne transkriptaze Superscript™ III RT in Platinum® *Taq* polimeraze DNA, 0,5 µl 200 nM sonde, 1,0 µl 200 nM posameznega začetnega oligonukleotida in 5,5 µl H_2O-DEPC, ki smo jo nanesli v jamice na optični ploščici (96-Well Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, ZDA) in v vsako reakcijo pomnoževanja dodali po 4 µl izolirane RNA. Vsak vzorec smo na ploščico nanesli v dveh ponovitvah. V zadnji reakcijski mešanici smo dodali 4 µl H_2O-DEPC in je služila kot kontrola kontaminacije (NTC, *angl. no template control*). Ploščico smo prekrili z optično folijo, centrifugirali v centrifugi Multifuge 1 S-R (Heraeus, Nemčija) 5 minut pri 4300 cfu in 4 °C in vstavili v aparaturo ABI PRISM 7000 Sequence Detection

System (Applied Biosystems, ZDA), v kateri je potekala reakcija pomnoževanja v realnem času.

Z metodo RT-PCR v realnem času smo virusno nukleinsko kislino pomnoževali s smiselnim začetnim oligonukleotidom Hep1F in protismiselnim začetnim oligonukleotidom Hep 4 ter sondo Hep-pro (tabela 17).

Za dokaz virusne RNA smo uporabili detekcijski sistem, ki temelji na sondi TaqMan.

Sonda Hep-pro je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilom FAM (6-karboksifluorescein), na 3' koncu pa ima dušilno barvilo (NFQ, *angl. non-fluorescent quencher*) in kovalentno vezano molekulo MGB (*angl. minor groove binding*), ki se veže v mali žleb dvojne vijačnice in omogoča stabilnejšo vezavo sonde na tarčno zaporedje.

Tabela 17: Začetni oligonukleotidi in sonda za ugotavljanje virusa hepatitisa A z RT-PCR v realnem času.

Oznaka primerjev in lovke	Nukleotidno zaporedje	Mesto prileganja v genomu
Hep1-F	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG	2389-2413
Hep 4	GCAAGCACCTGTGGGAGCTA	2325-2344
Hep - pro	6-FAM-ATTGAGGATCCAGTTTTA-MGB	2353-2370

3.6.2 Klasična metoda RT-PCR

Za klasično RT-PCR za pomnoževanje 247 bp dolgega kapsidnega odseka v kapsidni regiji (VP1) smo uporabili reagente za enostopenjsko reakcijo (SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum®, Invitrogen).

- 2 x reakcijska mešanica (0,4 mM vsakega od dNTP, 2,4 mM $MgSO_4$),
- mešanica encimov SuperScript™ II reverzna transkriptaza in Platinum® *Taq* polimeraza DNA.

Program pomnoževanja:

45 minut je pri 45 °C potekal reverzni prepis RNA v komplementarno DNA.

Sledilo je 2-minutno segrevanje pri 94 °C za inaktivacijo reverzne transkriptaze in razgradnjo dvojnovijačnic RNA-cDNA. V 50 temperaturnih ciklih se je zvrstilo:

- denaturacija cDNA: 30 sekund pri 94 °C,
- prileganje začetnih oligonukleotidov: 1 minuta pri 45 °C,
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov: 2 minuti pri 68 °C.

Cikli so se zaključili s 7-minutnim končnim podaljševanjem pri 68 °C in ohlajanjem reakcijske mešanice na 4 °C.

Začetni oligonukleotidi so opisani v tabeli 18.

Tabela 18: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje virusa hepatitisa A z metodo RT-PCR.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'–3'	Mesto v genomu	Vir
Hep1-F	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG	2389-2413	Le Guyader in sod., 1994
Hep2-R	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	2167-2192	

Verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo so potekale v termopomnoževalniku (T3, BIOMETRA, Nemčija). Reakcijske mešanice so vsebovale dve reakcijski mešanici (0.4 mM dNTP, 3.2 mM MgSO4), 1 µl 20 pmol začetnih oligonukleotidov (tabela 17), 1 µl encima SuperScript® III RT/ Platinum® *Taq* Mix (Invitrogen™, ZDA). Za pomnoževanje smo v 50 µl reakcijskih mešanicah uporabili 4 µl izolirane RNA.

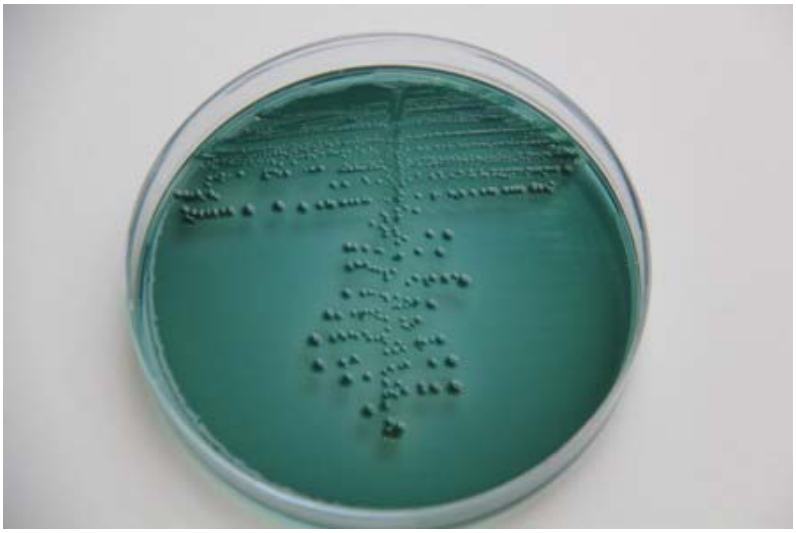
3.6.3 Elektroforeza v agaroznem gelu

Postopek elektroforeze smo izvajali enako, kot je opisano v poglavju norovirusov (točka 3.5.5 Elektroforeza v agaroznem gelu).

4 REZULTATI

4.1 Dokaz bakterije *V. parahaemolyticus*

Bakterije *V. parahaemolyticus* na gojišču TCBS oblikujejo modrozelene kolonije premera 2 mm (slika 18). Izolirali smo jih po 18-urni obogatitvi le iz enega vzorca (0,6 %). Ta vzorec je bil leta 2006 nabran v Seči.



Slika 18: Kolonije *V. parahaemolyticus* na agarju TCBS.

Na agarju TCBS so zrasle tudi nekatere druge kolonije, ki fermentirajo saharozo in smo jih potrdili s komercialnim testom API 20E kot *V. alginolyticus*. Bakterije, ki smo jih ugotovili na agarju TCBS in niso fermentirale saharoze, so bile še *Photobacterium damselae* in *V. vulnificus* (tabela 19).

Leta 2006 smo v petih vzorcih ugotovili prisotnost vrstno specifičnih genov za *V. parahaemolyticus* (tabela 9). Dva vzorca sta bila nabrana v Seči (junija in avgusta), dva v Strunjanu (avgusta) in en na Debelem rtiču (julija). Iz junijskega vzorca iz Seče smo izolirali tudi kolonijo *V. parahaemolyticus* z gojiščno metodo, jo potrdili s komercialnim testom API 20E in tudi z verižno reakcijo s polimerazo.

V letu 2007 smo v štirih vzorcih ugotovili prisotnost gena *toxR* in *tlh*. Trije vzorci so bili iz Strunjana (dva oktobrska in novembrski), eden pa z Debelega rtiča (oktobra). Pri oktobrskem vzorcu iz Strunjana smo tudi detektirali gen za hemolizin *trh* (tabela 19).

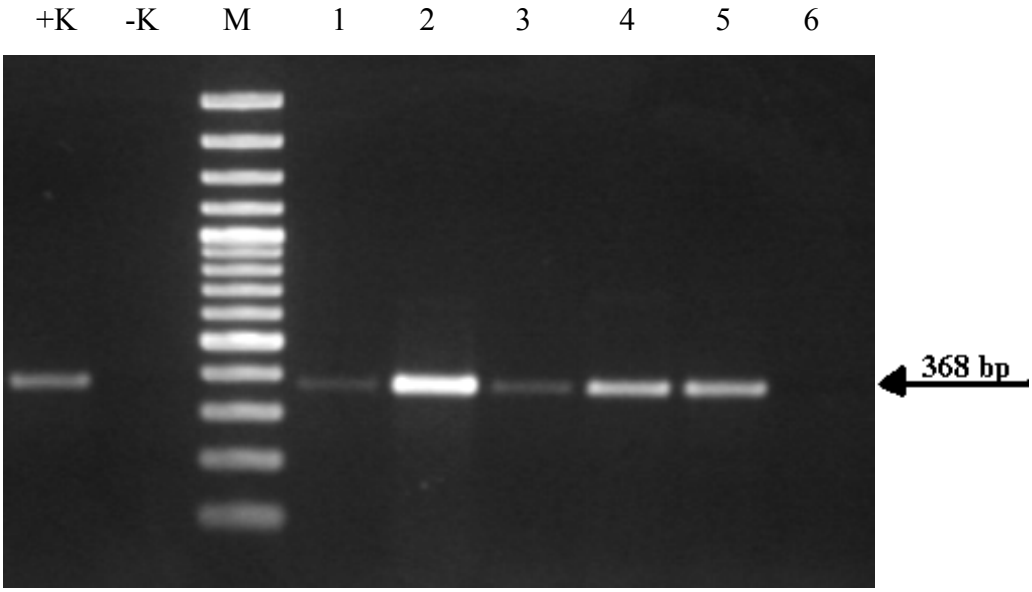
Leta 2008 smo pregledali 74 vzorcev in pri petnajstih ugotovili gena *toxR* in *tlh*. Štirje od teh vzorcev so izvirali iz Seče (maja, dva junija in julija), pet iz Strunjana (junij, dva julija in dva julija), pet z Debelega rtiča (junija, trije julija in avgusta) in en vzorec iz prosto nabranih školjk (julij) iz področja Pirana.

Tabela 19: Rezultati molekularnih in klasičnih preiskav v letih 2006−2008; vzorci, pri katerih smo ugotovili *V. parahaemolyticus* z verižno reakcijo s polimerazo (geni: *tox*R, *tlh* in *tdh*, *trh*) in z agarjem TCBS (direktno, po 6- in po 18-urni obogatitvi).

Leto	Število vzorcev	*Vibrio parahaemolyticus*						Izolacija ostalih bakterij
		Pozitivni na gen *toxR*	Pozitivni na gen *tlh*	Pozitivni na gen *tdh* in/ali *trh*	Izolacija iz neredčenih vzorcev	Izolacija po 6-urni obogatitvi	Izolacija po 18-urni obogatitvi	
2006	62	5 (8,1%)	5 (8,1%)	0	0	0	1 (1,6%)	*V. alginolyticus* *V. vulnificus* *P. damselae*,
2007	32	4 (12,5%)	4 (12,5%)	1 *trh* (3,1%)	0	0	0	*V. alginolyticus* *V. vulnificus* *P. damselae*
2008	74	15 (20,2%)	15 (20,2%)	0	0	0	0	*V. alginolyticus* *V. vulnificus*
Skupno (%)	**168**	**24 (14,2%)**	**24 (14,2%)**	**1 *trh* (0,6%)**	**0**	**0**	**1 (0,6%)**	

Skupno smo v letih od 2006 do 2008 v 24 (14,2 %) od 168 preiskanih vzorcih školjk dokazali prisotnost gena *toxR* in *tlh* v (tabela 19, slika 19). Leta 2006 je bilo pozitivnih na oba gena 5 od 62 vzorcev (8.1 %) (tabela 20), naslednje leto smo prisotnost genov potrdili pri 4 od 32 (12.5 %) in leta 2008 pri 15 od 74 (20.2 %) vzorcev (tabela 21).

Vrstno specifična gena *toxR* in *tlh* smo v preiskovanem obdobju ugotovili skupno v šestih vzorcih iz Seče, desetih iz Strunjana, sedmih z Debelega rtiča ter v enem, ki je bil prosto nabran na področju Pirana (slika 19).



Slika 19: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja s PCR in začetnima oligonukleotidoma tox R/tox F. K+ pozitivna kontrola (sev 2346), K - negativna kontrola (gojišče APW), M – standard velikosti 100bp, vzorci školjk: 1–6. Velikost produktov je 368 bp.

Tabela 20: Pregled vzorcev iz leta 2006, ki smo jih preiskali na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus*. Pri označenih (rdeči) smo bakterijo potrdili.

2006	Datum odvzema	Školjčišče	Rezultat gojiščne preiskave	Rezultat molekularne preiskave	2006	Datum odvzema	Školjčišče	Rezultat gojiščne preiskave	Rezultat molekularne preiskave
1	28.3.	Seča	neg	neg	**42**	6.10.	Seča	neg	neg
2	23.5.	Strunjan	neg	neg	**43**	10.10.	Debeli rtič	neg	neg
3	12.6.	Seča	poz	poz *toxR, tlh*	**44**	10.10.	Strunjan	neg	neg
4	12.6.	Strunjan	neg	neg	**45**	16.10.	Seča	neg	neg
5	21.6.	Strunjan	neg	neg	**46**	20.10.	Debeli rtič	neg	neg
6	27.6.	Debeli rtič	neg	neg	**47**	25.10.	Seča	neg	neg
7	27.6.	Debeli rtič	neg	neg	**48**	25.10.	Seča	neg	neg
8	6.7.	Strunjan	neg	neg	**49**	26.10.	Seča	neg	neg
9	6.7.	Seča	neg	neg	**50**	26.10.	Debeli rtič	neg	neg
10	12.7.	Seča	neg	neg	**51**	26.10.	Strunjan	neg	neg
11	13.7.	Strunjan	neg	neg	**52**	3.11.	Seča	neg	neg
12	13.7.	Seča	neg	neg	**53**	3.11.	Strunjan	neg	neg
13	22.7.	Seča	neg	neg	**54**	9.11.	Seča	neg	neg
14	22.7.	Strunjan	neg	neg	**55**	9.11.	Debeli rtič	neg	neg
15	22.7.	Debeli rtič	neg	neg	**56**	24.11.	Strunjan	neg	neg
16	27.7.	Debeli rtič	neg	neg	**57**	24.11.	Strunjan	neg	neg
17	28.7.	Debeli rtič	neg	poz *toxR, tlh*	**58**	24.11.	Debeli rtič	neg	neg
18	3.8.	Strunjan	neg	neg	**59**	30.11.	Seča	neg	neg
19	3.8.	Seča	neg	poz *toxR, tlh*	**60**	30.11.	Debeli rtič	neg	neg
20	10.8.	Seča	neg	neg	**61**	30.11.	Strunjan	neg	neg
21	10.8.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*	**62**	14.12.	Seča	neg	neg
22	22.8.	Seča	neg	neg					
23	22.8.	Seča	neg	neg					
24	24.8.	Seča	neg	neg					
25	24.8.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*					
26	24.8.	Seča	neg	Neg					
27	24.8.	Strunjan	neg	neg					
28	24.8.	Debeli rtič	neg	neg					
29	12.9.	Debeli rtič	neg	neg					
30	12.9.	Strunjan	neg	neg					
31	12.9.	Seča	neg	neg					
32	15.9.	Seča	neg	neg					
33	15.9.	Debeli rtič	neg	neg					
34	2.10.	Debeli rtič	neg	neg					
35	2.10.	Debeli rtič	neg	neg					
36	2.10.	Seča	neg	neg					
37	2.10.	Strunjan	neg	neg					
38	2.10.	Seča	neg	neg					
39	6.10.	Seča	neg	neg					
40	6.10.	Debeli rtič	neg	neg					
41	6.10.	Strunjan	neg	neg					

Tabela 21: Pregled vzorcev iz leta 2007 in 2008, ki smo jih preiskali na prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus*. Pri označenih (rdeči) smo bakterijo potrdili.

2007	Datum odvzema	Školjčišče	Rezultat gojiščne preiskave	Rezultat molekularne preiskave
1	20.2.	Debeli rtič	neg	neg
2	20.2.	Debeli rtič	neg	neg
3	23.2.	Strunjan	neg	neg
4	23.2.	Strunjan	neg	neg
5	23.2.	Seča	neg	neg
6	25.4.	Strunjan	neg	neg
7	25.4.	Strunjan	neg	neg
8	25.4.	Strunjan	neg	neg
9	10.5.	Seča	neg	neg
10	10.5.	Debeli rtič	neg	neg
11	10.5.	Strunjan	neg	neg
12	31.7.	Seča M.	neg	neg
13	2.8.	Seča	neg	neg
14	2.8.	Strunjan	neg	neg
15	12.10.	Seča M.	neg	neg
16	12.10.	Strunjan M.	neg	neg
17	12.10.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh, trh*
18	12.10.	Debeli rtič	neg	poz *toxR, tlh*
19	18.10.	Strunjan	neg	neg
20	18.10	Seča	neg	neg
21	18.10	Debeli rtič	neg	neg
22	26.10.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*
23	26.10.	Seča	neg	neg
24	26.10.	Debeli rtič	neg	neg
25	9.11.	Strunjan	neg	neg
26	9.11.	Seča	neg	neg
27	22.11.	Debeli rtič	neg	neg
28	22.11.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*
29	22.11.	Seča	neg	neg
30	27.11.	Seča M.	neg	neg
31	27.11.	Strunjan M.	neg	neg
32	27.11.	Piran M.	neg	neg

2008	Datum odvzema	Školjčišče	Rezultat gojiščne preiskave	Rezultat molekularne preiskave
1	25.1.	Strunjan	neg	neg
2	30.1.	Debeli rtič	neg	neg
3	30.1.	Debeli rtič	neg	neg
4	30.1.	Debeli rtič	neg	neg
5	30.1.	Seča M.	neg	neg
6	30.1.	Strunjan M.	neg	neg
7	26.2.	Seča M.	neg	neg
8	26.2.	Strunjan M.	neg	neg
9	27.3.	Debeli rtič	neg	neg
10	27.3.	Debeli rtič	neg	neg
11	17.4.	Seča	neg	neg
12	17.4.	Seča	neg	neg
13	17.4.	Seča	neg	neg
14	28.4.	Strunjan M.	neg	neg
15	28.4.	Seča M.	neg	neg
16	8.5.	Debeli rtič	neg	neg
17	8.5.	Seča	neg	neg
18	8.5.	Strunjan	neg	neg
19	27.5.	Seča M.	neg	neg
20	27.5.	Strunjan M.	neg	neg
21	27.5.	Piran d., M.	neg	neg
22	27.5.	Seča	neg	poz *toxR, tlh*
23	11.6.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*
24	11.6.	Seča	neg	poz *toxR, tlh*
25	11.6.	Debeli rtič	neg	poz *toxR, tlh*
26	30.6.	Strunjan	neg	neg
27	30.6.	Seča	neg	poz *toxR, tlh*
28	2.7.	Debeli rtič	neg	poz *toxR, tlh*
29	2.7.	Piran d, M.	neg	poz *toxR, tlh*
30	10.7.	Debeli rtič	neg	poz *toxR, tlh*
31	10.7.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*
32	10.7.	Seča	neg	neg
33	17.7.	Debeli rtič	neg	neg
34	17.7.	Strunjan	neg	neg
35	17.7.	Seča	neg	neg
36	23.7.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*
37	23.7.	Seča	neg	neg
38	25.7.	Debeli rtič	neg	poz *toxR, tlh*
39	27.7.	Strunjan	neg	poz *toxR, tlh*
40	30.7.	Piran M.	neg	neg
41	30.7.	Seča M.	neg	poz *toxR, tlh*

2008	Datum odvzema	Školjčišče	Rezultat gojiščne preiskave	Rezultat molekularne preiskave
42	30.7.	Strunjan M.	neg	poz *toxR, tlh*
43	7.8.	Strunjan	neg	neg
44	7.8.	Seča	neg	neg
45	8.8.	Debeli rtič	neg	poz *toxR, tlh*
46	13.8.	Strunjan	neg	neg
47	13.8.	Seča	neg	neg
48	14.8.	Debeli rtič	neg	neg
49	21.8.	Seča	neg	neg
50	21.8.	Strunjan	neg	neg
51	21.8.	Debeli rtič	neg	neg
52	27.8.	Strunjan M.	neg	neg
53	27.8.	Seča M.	neg	neg
54	27.8.	Piran M.	neg	neg
55	27.8.	Debeli rtič	neg	neg
56	27.8.	Seča	neg	neg
57	24.9.	Seča M.	neg	neg
58	24.9.	Strunjan M.	neg	neg
59	24.9.	Strunjand, M.	neg	neg
60	25.9.	Seča	neg	neg
61	3.10.	Debeli rtič	neg	neg
62	3.10.	Strunjan	neg	neg
63	3.10.	Seča	neg	neg
64	9.10.	Strunjan	neg	neg
65	9.10.	Debeli rtič	neg	neg
66	9.10.	Seča	neg	neg
67	16.10.	Seča	neg	neg
68	21.10.	Seča M.	neg	neg
69	21.10.	Strunjan M.	neg	neg
70	21.10.	Piran M.	neg	neg
71	4.11.	Debeli rtič	neg	neg
72	13.11.	Seča	neg	neg
73	13.11.	Strunjan	neg	neg
74	13.11.	Debeli rtič	neg	neg

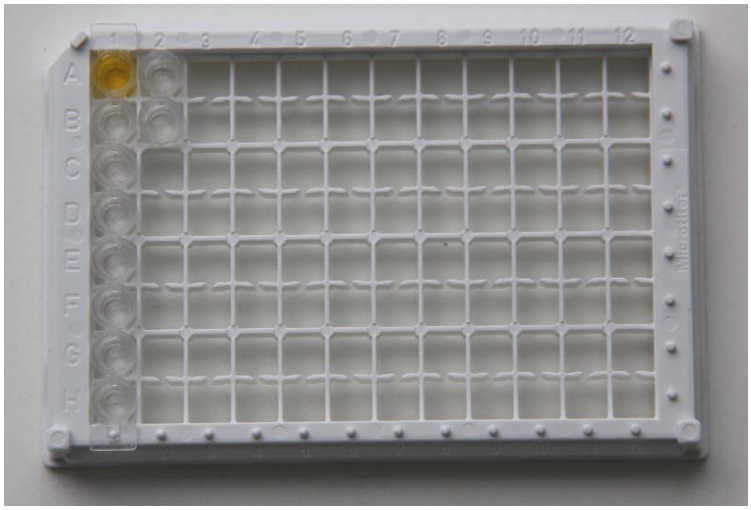
4.2 Verotoksična bakterija *E. coli*

Z metodo imunomagnetne separacije smo iz dveh vzorcev izolirali sumljive kolonije, vendar smo z nadaljnjim postopkom sum na prisotnost verotoksične *E. coli* v vzorcu ovrgli, saj njihova biokemijska slika ni bila značilna. V vseh 39 preiskanih vzorcih VTEC nismo ugotovili.

S testom ELISA (Ridascreen® Verotoxin, R−Biopharm, Nemčija) (slika 20) smo ugotavljali toksine *E. coli* (VT1 in VT2). Z validacijo testa smo lahko dokazali kontaminacijo vzorca pri najmanj 10 CFU *E. coli* v vzorcu. Enako mejo detekcije smo določili tudi pri vzorcu, ki smo mu dodali 270 CFU bakterijske kulture *P. aeruginosa*.

Po 10-dnevnem zamrzovanju vzorcev pri −70 °C in tudi pri hranjenju pri 4 °C smo bujon s kulturami inkubirali 24 ur pri 37 °C. Ostal je prozoren, kar pomeni, da bakterije niso preživele obeh postopkov shranjevanja.

V 85 preiskanih vzorcih toksinov *E. coli* (VT1 in VT2) nismo ugotovili.



Slika 20: Rezultati testa ELISA (Ridascreen® Verotoxin, R-Biopharm, Nemčija). Intenzivnost rumene barve odraža prisotnost verotoksinov. V jamici A1 je nanešena pozitivna kontrola, v jamici B1 negativna kontrola – samo gojišče. V jamicah C1, D1, E1, F1, G1, H1, A2 in B2 so nanešeni vzorci, pridobljeni v začetku avgusta 2008.

4.3 Norovirusi

4.3.1 Izolacija nukleinskih kislin

Pri primerjavi postopkov osamitve nukleinskih kislin s komercialnimi testi smo ugotovili, da je pri vzorcih školjk pomembno, da za nanos na membrano kolone ne uporabimo prevelike količine vzorca. Pri izolaciji s testom PureLink™ Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen™, ZDA) so delci tkiva zamašili membrano kolone. Ta komercialni test je namenjen izolaciji RNA in DNA iz vzorcev, ki ne vsebujejo celic ali tkiv, zato smo poskusili vzorce školjk predhodno prečistiti. Nukleinske kisline smo ekstrahirali s trizolom in kloroformom ter jih na koncu prečistili še z gelom za ločevanje vzorcev različne gostote (MaxTract High Density, Qiagen, Nemčija). Tako smo dobili vodno fazo z nukleinskimi kislinami, ki smo ji dodali nosilno RNA in postopek nadaljevali po navodilih proizvajalca.

4.3.2 Preverjanje koncentracije nukleinskih kislin

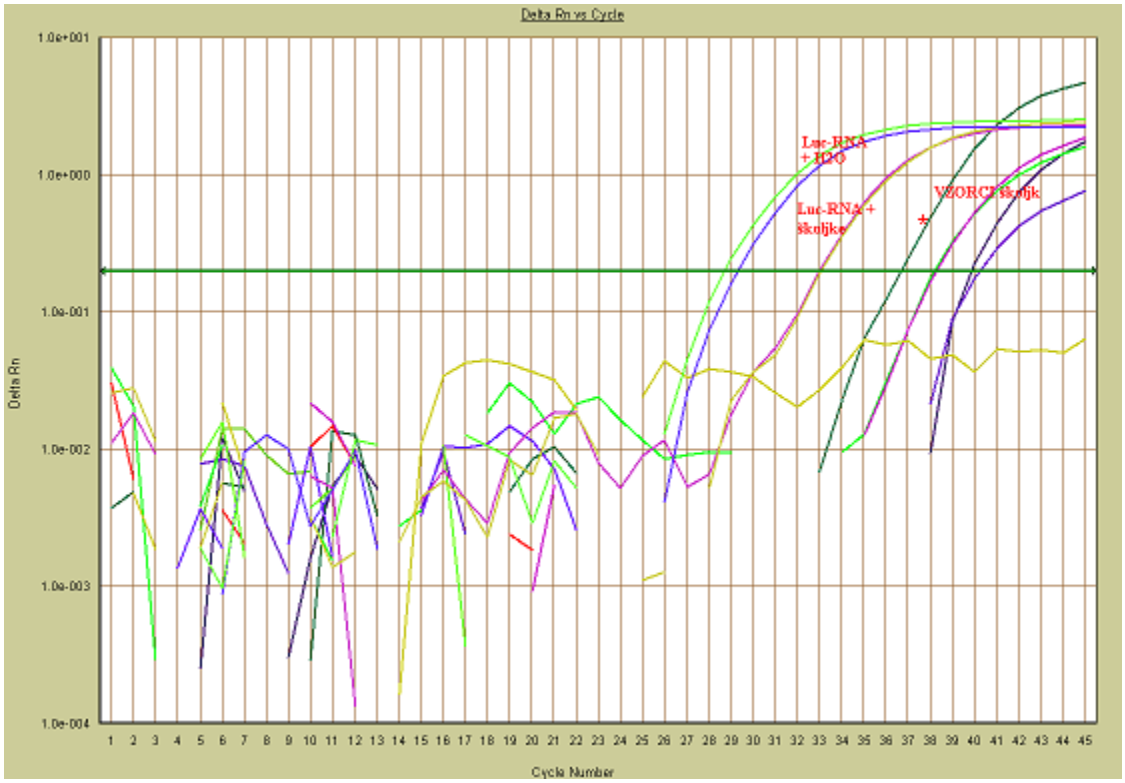
Pri preverjanju koncentracije nukleinskih kislin smo v vzorcih nukleinskih kislin, izoliranih s komercialnim testom PureLink™ Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen™, ZDA), izmerili visoke absorbance pri valovni dolžini 260 nm kot tudi pri 230 nm. Čiste nukleinske kisline absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini 260 nm, medtem ko pri 230 nm absorbirajo svetlobo nečistoče, kot so ogljikovi hidrati in fenol. To pomeni, da so bile v vzorcih poleg nukleinskih kislin prisotne tudi nečistoče.

Pri vzorcih, pri katerih smo uporabili komercialni test RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija), smo izmerili visoke vrednosti absorbance pri valovni dolžini 260 nm, pri 230 in 280 nm so bile vrednosti nižje, razmerje med absorbanco pri 260 nm in 230 nm (A260/A230) je bilo večje od 2, razmerje med A260/A280 pa blizu 2. S to metodo smo torej izolirali čistejšo nukleinsko kislino.

4.3.3 Dokazovanje virusne RNA z metodo RT-PCR v realnem času

Pri preliminarnih študijah smo morali vzorce celokupne RNA, izolirane z reagenti PureLink™ Viral RNA/DNA Kits (Invitrogen™, ZDA), redčiti 1:10 in 1:100, da smo pri pozitivnih kontrolah dobili signal na pomnoževalnem diagramu, vrednosti Ct pa so bile 40 in višje. Pri izolaciji s komercialnim testom RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija) smo dobili nižje vrednosti Ct brez redčenja, zato smo v nadaljevanju izolacijo RNA opravili s slednjim testom.

Pri vzorcih vode s kontrolno RNA so bile vrednosti Ct nižje kot pri vzorcih školjk. V povprečju so se razlikovale za vrednost 3 Ct (slika 21). Pri posameznih vzorcih (označeno z znakom * na sliki 21), smo lahko določili vrednost Ct le v enem od dvojno nanešenih vzorcev.



Slika 21: Rezultat pomnoževanja z RT-PCR v realnem času. Prvi dve krivulji predstavljata pomnoževanje Luc-RNA, dodane negativni kontroli, drugi dve krivulji pa pomnoževanje Luc-RNA, dodane v vzorce školjk. Vrednosti Ct treh testiranih vzorcev školjk ponazarjajo označene krivulje. Ugotavljali smo noroviruse genetske skupine II.

– Pomnoževanje tarčnega odseka genoma norovirusov na stiku ORF1-ORF2

Z metodo RT-PCR v realnem času smo dokazali noroviruse v 28 od 168 vzorcev (16,7 %). Dokazani norovirusi so pripadali obema genetskima skupinama. Pri 14 vzorcih smo ugotovili noroviruse obeh genskih skupin, v enem vzorcu samo prisotnost genske skupine I in v 13 vzorcih le noroviruse genske skupine II (tabela 22).

Tabela 22: Pregled rezultatov testiranj školjk na prisotnost norovirusov z RT-PCR v realnem času v obdobju od leta 2006 do leta 2008.

VZORCI	*VSI*	*POZITIVNI PO SKUPINAH*			*POZITIVNI*	*NEGATIVNI*
LETO		*GI*	*GII*	*GI in GII*	*SKUPAJ (%)*	
2006	**44**	0	3	1	**4 (9,1)**	40
2007	**63**	0	4	5	**9 (14,3)**	54
2008	**61**	1	6	8	**15 (24,6)**	46
SKUPAJ	**168**	**1**	**13**	**14**	**28 (16,7)**	140

Leta 2006 smo pri testiranju 44 vzorcev školjk dokazali noroviruse v štirih vzorcih. Gensko skupino II smo ugotovili pri treh vzorcih, v enem pa obe genski skupini (tabela 22).

Leta 2007 smo testirali 63 vzorcev školjk. Pri devetih vzorcih smo dokazali noroviruse. V štirih vzorcih smo ugotovili le gensko skupino II, v petih vzorcih smo potrdili obe genski skupini (tabela 22).

Leta 2008 smo pri testiranju 61 vzorcev školjk dokazali noroviruse v 15 vzorcih, in sicer gensko skupino II v šestih vzorcih, gensko skupino I pa le v enem vzorcu. Vzorcev, v katerih smo ugotovili obe genski skupini, je bilo osem (tabela 22).

V letu 2006 smo noroviruse genske skupine I dokazali le v enem vzorcu iz Strunjana, leta 2007 v petih vzorcih, ki so bili nabrani v različnih školjčiščih (Debeli rtič, Strunjan in prosto nabrane iz Pirana). V letu 2008 smo ugotovili noroviruse genske skupine I v devetih vzorcih, ki so izhajali iz vseh preiskovanih školjčišč (tabela 23).

Podobno smo v vsem preiskovalnem obdobju dokazali tudi noroviruse genske skupine II. V vseh školjčiščih smo leta 2006 ugotovili noroviruse genske skupine II v štirih vzorcih. Leta 2007 smo jih ugotovili v devetih vzorcih, ki so izhajali iz školjčišč, ter v obeh prosto nabranih vzorcih iz Pirana in Strunjana. Leta 2008 so bili norovirusi genske skupine II prisotni v 15 vzorcih (14 iz školjčišč in 1 iz prosto živečih klapavic iz Pirana) (tabela 23).

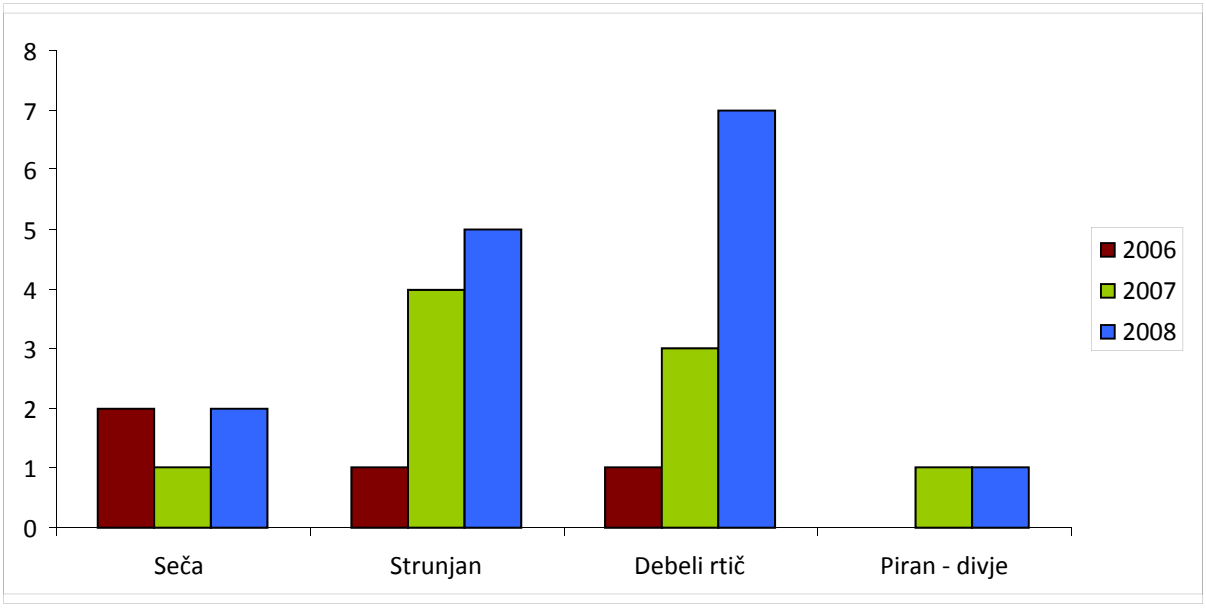
Tabela 23: Pomnoževanje tarčnega odseka genoma norovirusov na stiku ORF1-ORF2. Pregled vzorcev, v katerih smo ugotovili norovirusno RNA. Pozitivni rezultat je prikazan z vrednostmi Ct.

Zaporedna št.	Mesto vzorčenja	Datum odvzema	Ct GI	Ct GII
1.	Seča	26/10/06	/	39,2
2.	Debeli rtič	26/10/06	/	36,6
3.	Strunjan	26/10/06	40,0	39,0
4.	Seča	9/11/06	/	39,4
5.	Strunjan	19/1/07	/	39,2
6.	Debeli rtič	23/1/07	/	37,0
7.	Debeli rtič	12/10/07	39,6	36,8
8.	Strunjan	26/10/07	38,7	36,9
9.	Debeli rtič	22/11/07	40,0	39,0
10.	Strunjan	22/11/07	40,1	37,3
11.	Seča	22/11/07	/	40,0
12.	Piran, divje	26/11/07	35,5	33,7
13.	Strunjan	26/11/07	/	37,0
14.	Strunjan	25/1/08	39,7	35,9
15.	Seča	30/1/08	39,2	38,4
16.	Strunjan	30/1/08	39,2	37,1
17.	Debeli rtič	30/1/08	36,4	35,0
18.	Strunjan	26/2/08	/	37,6
19.	Debeli rtič	27/2/08	39,0	38,4
20.	Debeli rtič	27/3/08	/	38,2
21.	Piran, divje	2/7/08	38,5	37,3
22.	Debeli rtič	10/7/08	37,8	38,9
23.	Debeli rtič	17/7/08	/	38,9
24.	Debeli rtič	4/11/08	/	38,2
25.	Seča	13/11/08	/	40,0
26.	Strunjan	13/11/08	41,5	/
27.	Debeli rtič	13/11/08	/	37,2
28.	Strunjan	28/11/08	39,2	37,3

Rezultati na sliki 22 prikazujejo naraščanje kontaminacije školjk z norovirusi v preiskovanem obdobju. Tako smo v letu 2006 v Seči ugotovili norovirusno RNA pri dveh od skupno 23 vzorcih, iz Strunjana v enem od 10 in v enem od skupno 11 z Debelega rtiča (slika 22).

Leta 2007 smo ugotovili norovirusno RNA pri enem od 25 vzorcev iz Seče, pri treh od 16 vzorcev z Debelega rtiča, pri štirih od 20 vzorcev iz Strunjana ter pri enem od dveh vzorcev prostonabranih s področja Pirana (slika 22).

Leta 2008 smo norovirusno RNA ugotovili pri dveh od 23 vzorcev iz Seče, pri sedmih od skupno 13 vzorcev z Debelega rtiča, pri petih od skupno 21 iz Strunjana ter pri enem od treh prosto nabranih s področja Pirana (slika 22).



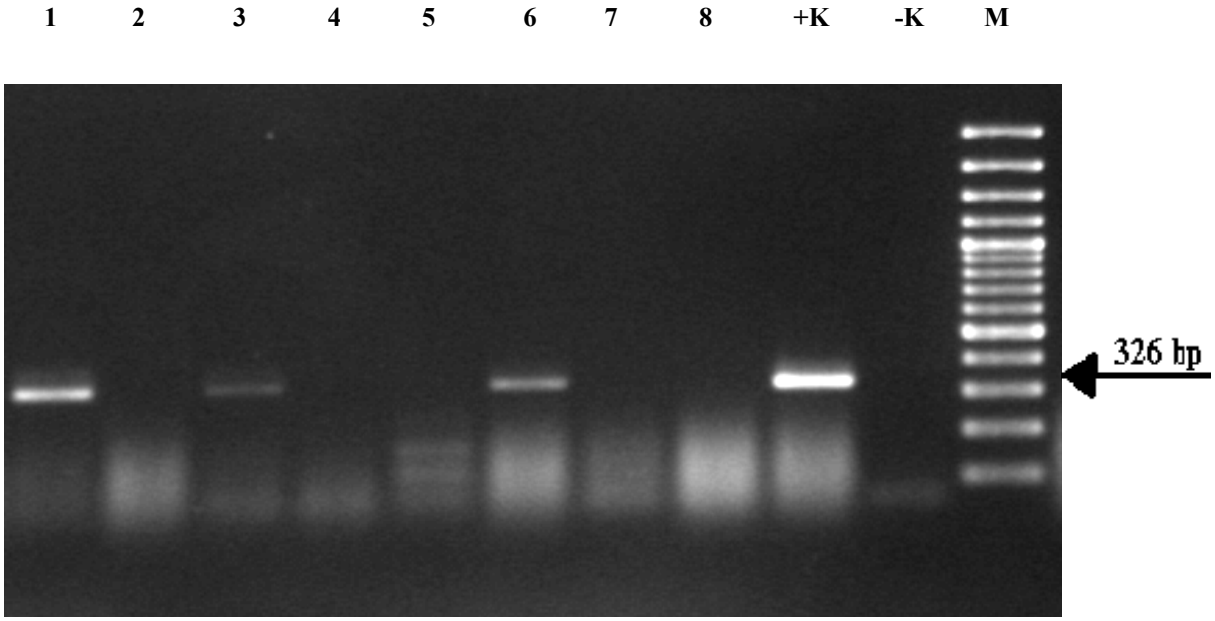
Slika 22: Pregled vzorcev, pozitivnih na norovirusno RNA z RT-PCR v realnem času, po posameznih školjčiščih (od junija 2006 do decembra 2008).

4.3.4 Dokazovanje norovirusne RNA s klasično metodo RT-PCR

Preiskovane vzorce smo testirali s tremi pari različnih začetnih oligonukleotidov (JV12Y/JV13I, G1SKF/G1SKR in G2SKF/G2SKR), in tako dokazovali dva različna tarčna odseka virusa (ORF1 in ORF2) dveh genskih skupin (I in II).

4.3.4.1 Pomnoževanje odseka gena za polimerazo (ORF1)

Z začetnimi oligonukleotidi JV12Y/JV13I smo pomnoževali 326 bp dolg odsek izolirane RNA. Sprva smo v programu pomnoževanja v 35 ciklih temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov nastavili na 37 °C, temperaturo reverzne transkripcije pa na 42 °C, vendar nismo dobili pozitivnih rezultatov. Temperaturo prileganja smo nato zvišali na 40 °C, reverzno transkripcijo na 45 °C in število ciklov na 50. S tako spremenjenim programom smo dobili pomnožke tako pri pozitivni kontroli kot pri vzorcih (slika 23).



Slika 23: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnima oligonukleotidoma JV12Y/JV13I. 1−8 vzorci: 1 - Debeli rtič;12. 10. 2007, 2 - Strunjan;12. 10. 2007, 3 - Seča;30. 1. 2008, 4 - Strunjan;15. 2. 2008, 5 - Seča; 8. 5. 2008, 6 - Piran;2. 7. 2008, 7 - Seča;10. 7. 2008, 8 - Strunjan;13. 11. 2008, +K - pozitivna kontrola, -K - negativna kontrola, M – standard DNA velikosti 100 bp. Velikost pomnožkov je 326 bp.

Od 28 vzorcev, pri katerih smo z RT-PCR v realnem času ugotovili norovirusno RNA iz genske skupine I in/ali II, smo s klasično metodo RT-PCR dobili produkt na agaroznem gelu pri 18 vzorcih (tabela 24).

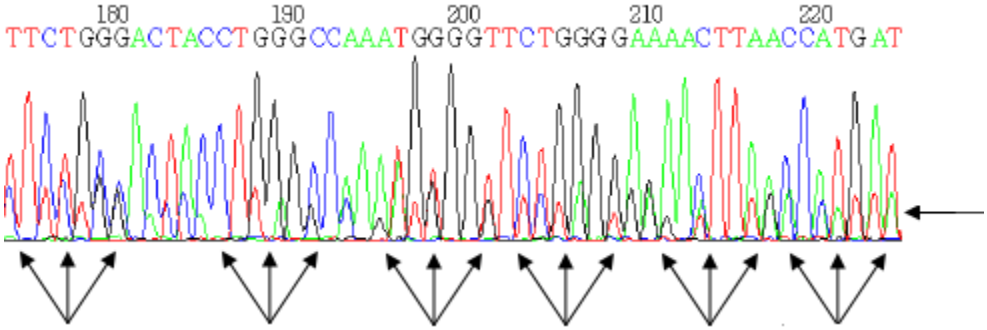
Produktom smo določili nukleotidno zaporedje. Pri dveh vzorcih sekvenčna reakcija ni uspela, pri 16 vzorcih pa so bili signali sekvenčne reakcije zadovoljivi.

Pri petih sekvencah smo ugotovili v zaporedju več prekrivajočih se nukleotidov (slika 24), kar je nakazovalo na kontaminacijo školjk z različnimi sevi norovirusov. Te školjke so bile vzorčene na Debelem rtiču (26. 10. 2006), na področju Pirana (26. 11. 2007 in 2. 7. 2008), na Debelem rtiču (13. 11. 2008) in v Strunjanu (28. 11. 2008). Enajstim produktom RT-PCR smo uspeli določiti nukleotidno zaporedje, deset zaporedij smo tudi shranili v gensko bazo (tabela 24).

Tabela 24: Rezultati pomnoževanja genoma norovirusov s klasično metodo RT-PCR.

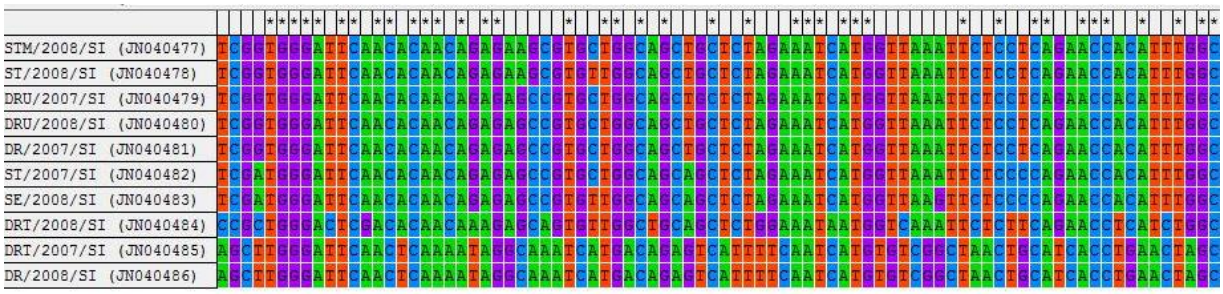
Št.	Mesto vzorčenja Oznaka vzorca	Datum odvzema	Rezultat pomnoževanja z oligonukleotidnimi začetniki /genska skupina (*angl. genogroup* GG)					Oznaka sekvence v banki *(angl. Accesion Number)*
			JV12Y / JV13I	GG / podtip	G1SKF / G1SKR	GG	G2SKF /G2SKR	
1	Debeli rtič DRT/2006/SI	26/10/06	+ (mešana)		+	**I.1**	+ (mešana)	JN689231
2	Seča	9/11/06	+ (šibka)		-		+ (šibka)	
3	Debeli rtič DRU/2007/SI	23/1/07	+	**II.4 / 2006b**	-		-	JN040479
4	Debeli rtič DRT/2007/SI	12/10/07	+	**I.2**	+ (šibka)		-	JN040485
5	Debeli rtič DR/2007/SI	22/11/07	+	**II.4 / 2006b**	-		-	JN040481
6	Strunjan ST/2007/SI	22/11/07	+	**II.4 / 2006a**	-		-	JN040482
7	Piran M. PIM261107	26/11/07	+ (mešana)		+ (šibka)		+ (mešana)	
8	Strunjan (K11-07STM)	26/11/07	+	**II.4 / 2006b**	-		-	
9	Strunjan ST/2008/SI	25/1/08	+	**II.4 / 2006b**	-		+ (šibka)	JN040478
10	Seča SE300108	30/1/08	+ (šibka)		-		-	
11	Strunjan STM/2008/SI	30/1/08	+	**II.4 / 2006b**	-		-	JN040477
12	Debeli rtič DRT/2008/SI	30/1/08	+	**II.b**	-		+ (šibka)	JN040484
13	Debeli rtič DRU/2008/SI	27/2/08	+	**II.4 / 2006b**	-		-	JN040480
14	Piran divje PIR/2008/SI	2/7/08	+ (mešana)		+	**I.3**	-	JN689232
15	Debeli rtič DR/2008/SI	4/11/08	+	**I.2**	-		-	JN040486
16	Seča SE/2008/SI	13/11/08	+	**II.4 / 2008**	-		-	JN040483
17	Debeli rtič	13/11/08	+ (mešana)		-		-	
18	Strunjan	28/11/08	+ (mešana)		-		+ (mešana)	
Σ			**17**		**4**		**6**	

Nukleotidni zaporedji iz dveh vzorcev školjk, nabranih v Strunjanu 26. 11. 2007 (STM261107) in 30. 1. 2008 (STM/2008/SI), sta bili identični, prav tako tudi zaporedji z Debelega rtiča 22. 11. 2007 (DRT/2007/SI) in 4. 11. 2008 (DR/2008/SI).



Slika 24: Primer kromatogramskega zapisa odseka RdRp iz vzorca z Debelega rtiča (13. 11. 2008) z več prekrivajočimi se nukleotidnimi zaporedji (označeno s puščico).

Za vsak produkt RT-PCR smo imeli po dva kromatogramska zapisa. Prvi zapis je predstavljal nukleotidno zaporedje, ki smo ga pridobili s smiselnim začetnim oligonukleotidom, drugi pa zapis, ki smo ga pridobili s protismiselnim začetnim oligonukleotidom. Na podlagi primerjave obeh zapisov smo določili 285 nukleotidov dolga zaporedja, ki smo jih shranili v gensko bazo pod kodami od JN040477 do JN040486 (tabela 24). Delno nukleotidno zaporedje iz omenjenih desetih vzorcev prikazuje slika 25.

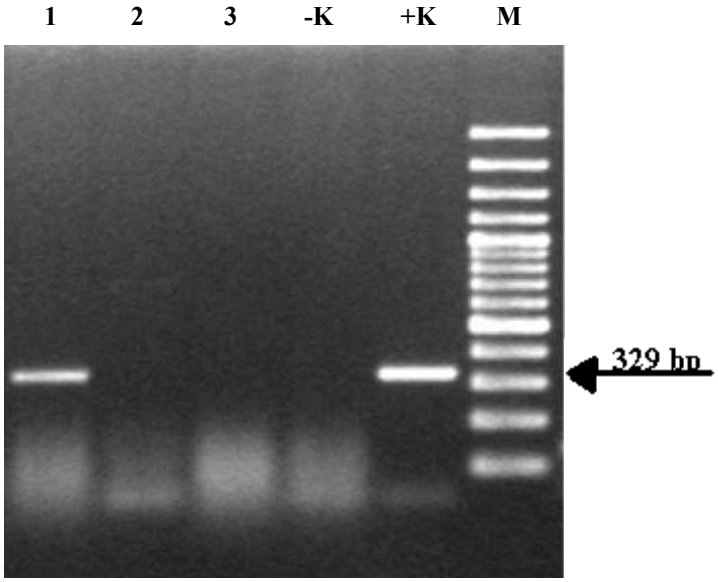


Slika 25: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij produktov sekvenciranja, ki smo jih shranili v genski bazi. Z zvezdico so označena mesta, ki so vsem sevom identična. Primerjavo smo naredili s programom ClustalW MEGA4.

4.3.4.2 Pomnoževanje kapsidnega odseka genoma (ORF2)

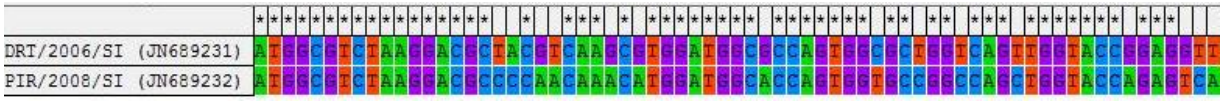
A) Genska skupina I

Vzorce, pri katerih smo z metodo RT-PCR v realnem času ugotovili norovirusno RNA (tabela 23), smo pomnoževali tudi z začetnimi oligonukleotidi G1SKF/G1SKR v odseku gena za kapsidni protein. Uspešno smo pomnožili virusno RNA, izolirano iz štirih vzorcev: iz dveh, vzorčenih 2. 7. 2008 in 26. 11. 2007 v Piranu, ter iz dveh, vzorčenih 26. 10. 2006 in 12. 10. 2007 (tabela 24) pri Debelem rtiču, in pri tem dobili produkte velikosti 329 bp ter jih dokumentirali na gelu (slika 26).



Slika 26: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnimi oligonukleotidi G1SKF/G1SKR; M marker, K- (negativna kontrola), 1-3 vzorci: 1 - Piran; 2. 7. 2008, 2 - Seča; 30. 1. 2008, 3 - Seča; 8. 5. 2008, K+ (pozitivna kontrola). Velikost pomnožkov je 329 bp.

V dveh primerih je bil signal na gelu prešibek in sekvenčne reakcije nismo mogli izvesti. Nukleotidno zaporedje smo tako določili le dvema produktoma: DRT/2006/SI, školjke, vzorčene 26. 10. 2006 na Debelem rtiču, in PIR/2007/SI, školjke, vzorčene 2. 7. 2007 na področju Pirana. Nukleotidni zaporedji dolgi 288 bp smo shranili v genski bazi pod kodama JN689231 in JN689232 (tabela 24). Med seboj se ujemata v 74,7 % nukleotidih (priloga 5) in v 77,1 % aminokislin (priloga 6). Odseke, ki so identični obema sevoma, prikazuje slika 27.



Slika 27: Primerjava delnih nukleotidnih zaporedij produktov sekvenciranja, ki smo jih shranili v genski bazi. Z zvezdico so označena mesta, ki so sevoma identična. Primerjavo smo naredili s programom ClustalW MEGA4.

B) Genska skupina II

RNA, izolirano iz vzorcev školjk, ki smo jo potrdili z metodo RT-PCR v realnem času, smo pomnožili še z začetnimi oligonukleotidi G2SKF/G2SKR. Pomnožen odsek na genu za kapsidni protein je bil dolg 343 bp.

Od 27 vzorcev, ki so bili pozitivni na noroviruse genske skupine II z RT-PCR v realnem času (tabela 23), smo pri šestih primerih dobili tudi produkt po pomnoževanju s klasično metodo RT-PCR (tabela 24). V treh primerih je bil signal produkta na gelu prešibek za uspešno sekvenčno reakcijo (Seča, 9. 11.2006; Strunjan, 25. 1. 2008; in Debeli rtič, 30. 1. 2008). Pri treh vzorcih (tabela 24) smo nukleotidno zaporedje določili (26. 10. 2006 z Debelega rtiča, 26. 11. 2007 s področja Pirana in 28.11. 2008 iz Strunjana), vendar smo iz sekvence ugotovili, da so bili v teh vzorcih prisotni mešani sevi norovirusov.

4.3.5 Filogenetska analiza nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij

A) Filogenetska analiza polimeraznega dela genoma

V filogenetsko drevo (slika 28) smo vključili tudi seve iz genske baze (tabela 14). Sevi, ki smo jih dokazali v naših vzorcih klapavic, so se umestili v dve genskih skupini, in sicer I in II. Med njimi smo določili tudi različne genotipe.

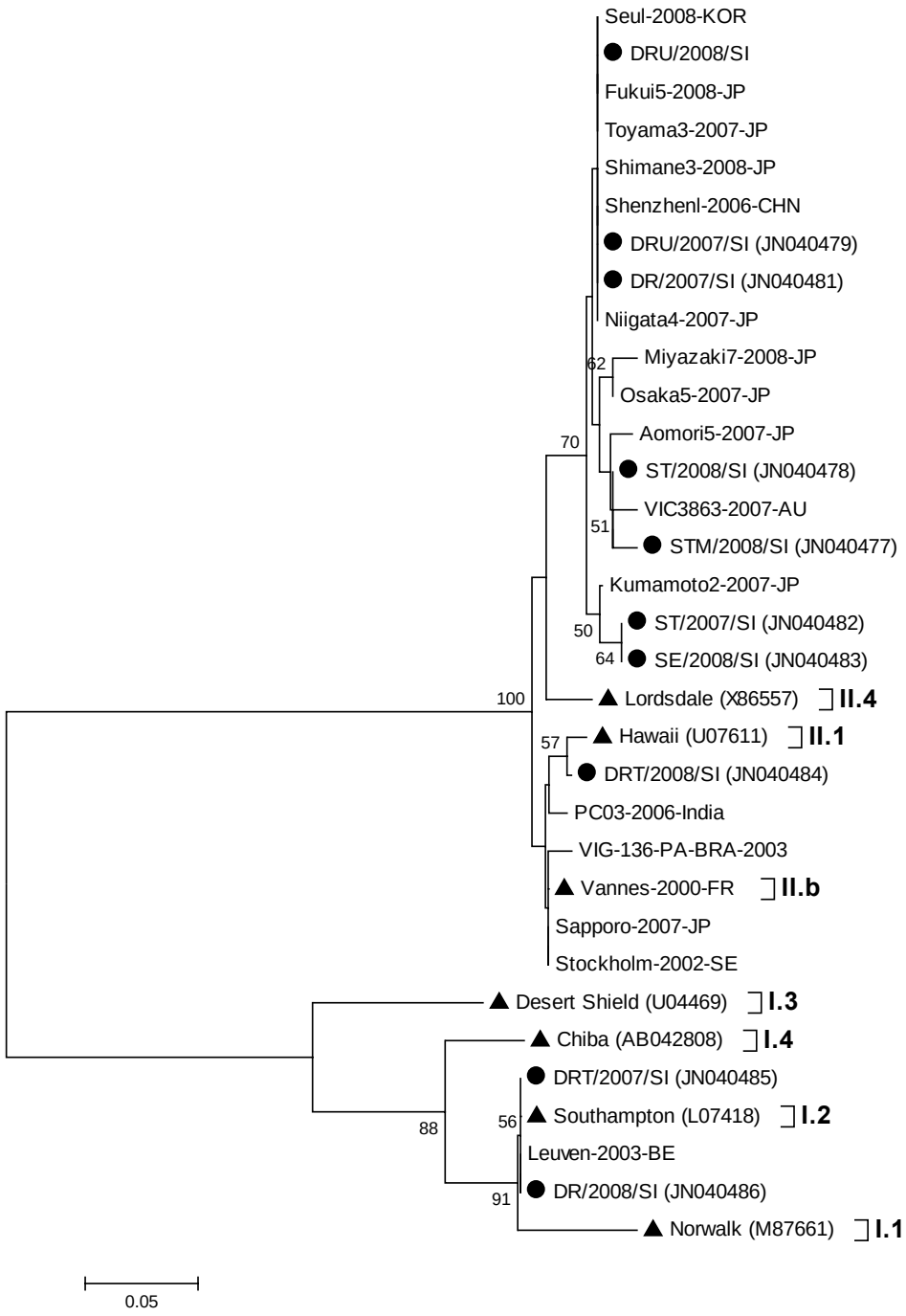
V genotip I.2 sta se uvrstila seva DRT/2007/SI in DR/2008/SI, ki se med seboj v nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju 100-odstotno ujemata (priloga 1 in 2). Z referenčnim sevom Southampton sta enaka v 95,8 % nukleotidnega in 100 % aminokislinskega zaporedja. Vzorčena sta bila na Debelem rtiču, vendar v različnih obdobjih: 12. 10. 2007 in 4. 11. 2008.

Sev z Debelega rtiča DRT/2008/SI se z referenčnim sevom genotipa II.b (Vannes) v nukleotidnem zaporedju ujema v 96,5 % (priloga 1), v aminokislinskem pa v 98,9 % (priloga 2). Kljub nekoliko manjšemu ujemanju v nukleotidnem zaporedju, ki je 83,5 % (priloga 1), se sev DRT/2008/SI z referenčnim sevom genske skupine II.1 (Hawaii) v aminokislinskem zaporedju ujema skoraj v enakem deležu kot s predhodnim, in sicer v 98,9 % (priloga 2).

Sevi, ki smo jih izolirali iz klapavic: DR/2007/SI, DRU/2008/SI in DRU/2007/SI, ter humani sevi iz Japonske, Koreje in Kitajske (Seul, Toyama3, Fukui5, Niigata4, Shimane3, Shenzhenl) imajo 100-odstotno enako aminokislinsko zaporedje (priloga 2). Seve smo uvrstili v genotip II.4, saj se z referenčnim sevom Lordsdale ujemajo v 90,2–90,9 % nukleotidnega (priloga 1) in v 95,8 % aminokislinskega zaporedja (priloga 2).

Tudi seva STM/2008/SI in ST/2008/SI sta uvrščena v genotip II.4, njuno aminokislinsko ujemanje z referenčnim sevom Lordsdale je 93,7 oziroma 94,7-odstotno (priloga 2). Aminokislinsko zaporedje obeh izoliranih sevov je s sevoma Aomori5 in VIV3863 enako v 97,9 oziroma 98,9 % (priloga 2). Tudi sev iz Strunjana, ki smo ga dobili z vzorčenjem 26. 11. 2007 (tabela 25) in ni bil shranjen v bazi, je identičen sevu STM/2008/SI. Uvrščamo ga prav tako v to skupino.

Seva ST/2007/SI in SE/2008/SI, ki sta glede na aminokislinsko zaporedje 95,8-odstotno enaka referenčnemu sevu Lordsdale, smo prav tako uvrstili v genotip II.4. Med seboj se ujemata v 94,7 % nukleotidnega zaporedja, aminokislinsko sta 100-odstotno enaka.



Slika 28: Filogenetsko drevo norovirusnih sevov, pripravljeno po metodi sosedskega odnosa aminokislinskega zaporedja na delu gena RdRp. Referenčne in druge tuje seve smo poiskali v bazi GenBank (tabela 14). Referenčni sevi so označeni z znakom▲, sevi iz školjk z znakom ●.

Pripravili smo tudi filogenetsko drevo (slika 29), kamor smo poleg sevov, izoliranih iz klapavic, vključili tudi slovenske seve, ki so jih izolirali Steyer in sodelavci (Steyer in sod., 2011). V primerjavo smo vključili tudi seve iz izvirov vode, iz površinskih voda in iz kliničnih primerov obolelih za gastroenteritisom v Sloveniji (tabela 15). V genotip II.4, gensko različico 2006b, smo uvrstili večino sevov iz školjk (DRU/2007/SI, DRU/2008/SI, DR/2007/SI, STM/2008/SI, ST/2008/SI). Sem so umeščeni tudi izolati iz pitne vode (V3/09, V7/09, V47/09, V17/08, V2/09) in iz kliničnih primerov obolelih ljudi v Sloveniji (2830/09, 580/07, 2791/09, 2889/09, 1732/07), z izjemo seva V1/09 (slika 29). V tej skupini se sevi iz školjk z ostalimi slovenskimi sevi ujemajo v 91,5–99,6 % nukleotidnega (priloga 3) in v 94,6–100 % aminokislinskega zaporedja (priloga 4).

Sev ST/2007/SI, genska različica 2006a, in sev SE/2008/SI, genska različica 2008, se s sevi iz kliničnih primerov obolelih za gastroenteritisi (288/05, 757/10, 756/10, 755/10 in 220/10) ujemata v 94,0−97,2 % na nukleotidnem nivoju, njuno aminokislinsko zaporedje pa je z omenjenimi sevi 100-odstotno identično (priloga 3 in 4).

Sev DRT/2008/SI se v aminokislinskem zaporedju ujema v 92,5–95,7 % s sevi iz vode in s kliničnimi sevi (priloga 4).

Sev ST/2007/SI (različica 2006a) in sev SE/2008/SI (različica 2008), ki se med seboj razlikujeta v 5,3 % nukleotidnega zaporedja, aminokislinsko zaporedje pa imata 100 % enako (priloga 3), se od sevov iz genske različice 2006b (DRU/2007/SI, DR/2007/SI, ST/2008/SI, STM/2008/SI in DRU/2008/SI) razlikujeta v 5,3−7,1 % nukleotidnega oziroma 2,2–4,3 % aminokislinskega zaporedja (priloga 3 in 4). Gensko različico 2006b smo potrdili pri vzorcu z Debelega rtiča januarja 2007. Različico 2006a smo ugotovili novembra 2007 v vzorcu iz Strunjana, gensko različico 2008 pa novembra 2008 v Seči (tabela 25).

Seva genotipa I.2 iz školjk (DRT/2007/SI in DR/2008/SI), ki sta med seboj 100 % identična v nukleotidnem zaporedju, se s sevi iz vode in sevi iz blata obolelih ljudi v nukleotidnem zaporedju ujemata 57,7–59,8 %, v aminokislinskem pa v 59,1–60,2 % (priloga 3 in 4).

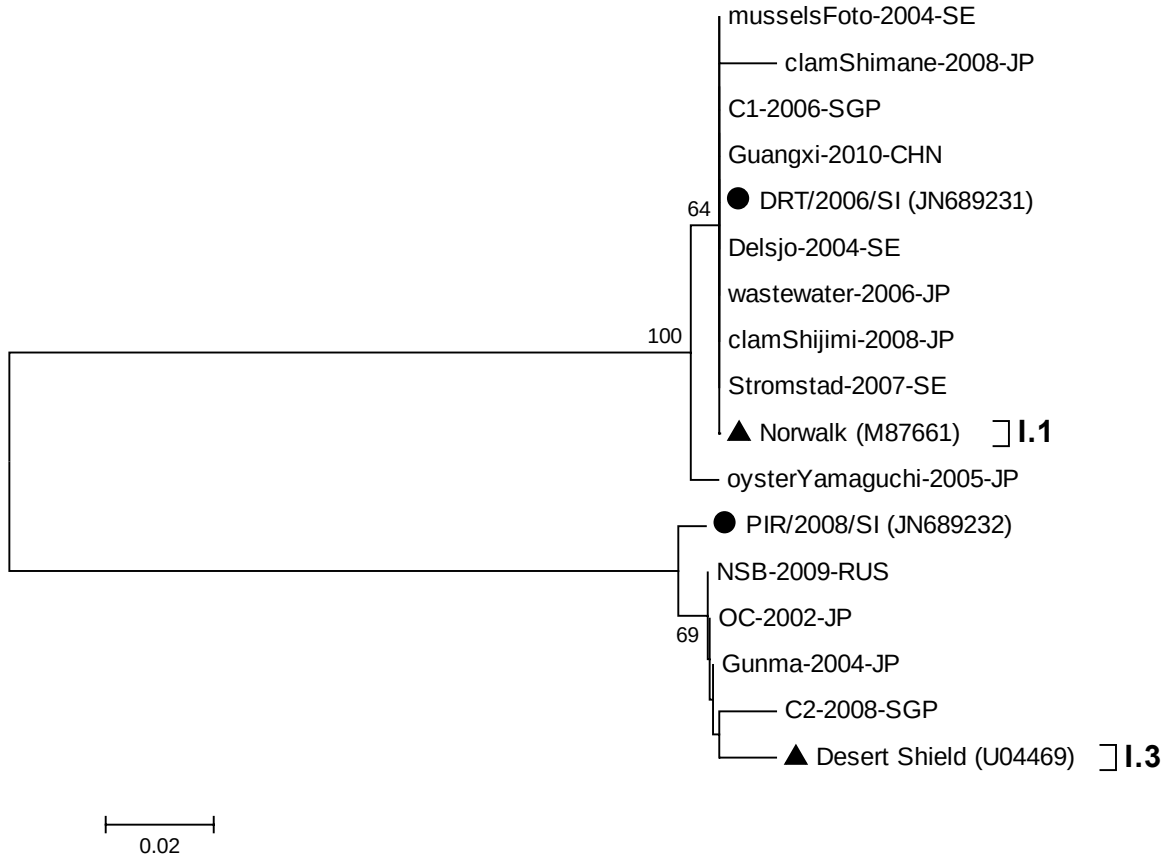
Slika 29: Filogenetsko drevo norovirusnih sevov, pripravljeno po metodi sosedskega odnosa aminokislinskega zaporedja na odseku gena RdRp. Vključili smo norovirusne seve iz školjk, ki so na sliki označeni z znakom ● (ta študija), seve norovirusov iz slovenskih voda (označen z modrim krožcem) in dokazanih v blatu obolelih ljudi, ki so v Sloveniji zboleli za gastroenteritisom (označeni z rdečim krožcem) (Steyer in sod., 2011). Genotipi in različice genotipov so označene s skalo poleg sevov.

B) Filogenetska analiza kapsidnega dela genoma

Za pomnoževanje kapsidne regije norovirusov smo uporabili enak pristop kot za polimerazno regijo. Dvema pomnožkoma: DRT/2006/SI in PIR/2008/SI smo določili nukleotidno zaporedje in ju shranili v genski bazi pod kodama JN689231 in JN689232 (tabela 24).

V filogenetsko drevo (slika 30) smo vključili tudi seve iz genske baze (tabela 16). Sev DRT/2006/SI (JN689231) se je umestil v genotip I.1, z referenčnim sevom Norwalk se ujema v 91,7 % nukleotidnega (priloga 5) in 100 % aminokislinskega zaporedja (priloga 6). V primerjavi z ostalimi sevi iz genske baze je na nukleotidnem nivoju 100-odstotno identičen švedskemu sevu (Stromstad), sevom iz Kitajske, Švedske, Singapurja in Japonske (musselsFoto, C1, Guangxi, Delsjo wastewater in clamShijimi) pa v 99,3 do 99,7 % (priloga 5), medtem ko je z vsemi omenjenimi sevi aminokislinsko zaporedje 100 % identično (priloga 6). V tem genotipu je opaziti med sevi večjo homogenost, saj so vsi, razen dveh sevov, ki so jih izolirali iz japonskih ostrig in ladink (oysterYamaguchi in clamShimane) in se ujemajo v 99 % aminokislinskega zaporedja, 100 % enaki (priloga 6).

Sev PIR/2008/SI (JN689232) se je umestil v genotip I.3. Z referenčnim sevom Desert Shield se ujema v 89,6 % nukleotidnega (priloga 5) oziroma 97,9 % aminokislinskega zaporedja (priloga 6). Njegovo ujemanje s sevi z Japonske, iz Rusije in Singapurja (NSB, OC, Gunma, in C2) iz genske baze je v nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju v 97,9 do 99,0 % (priloga 5 in 6).

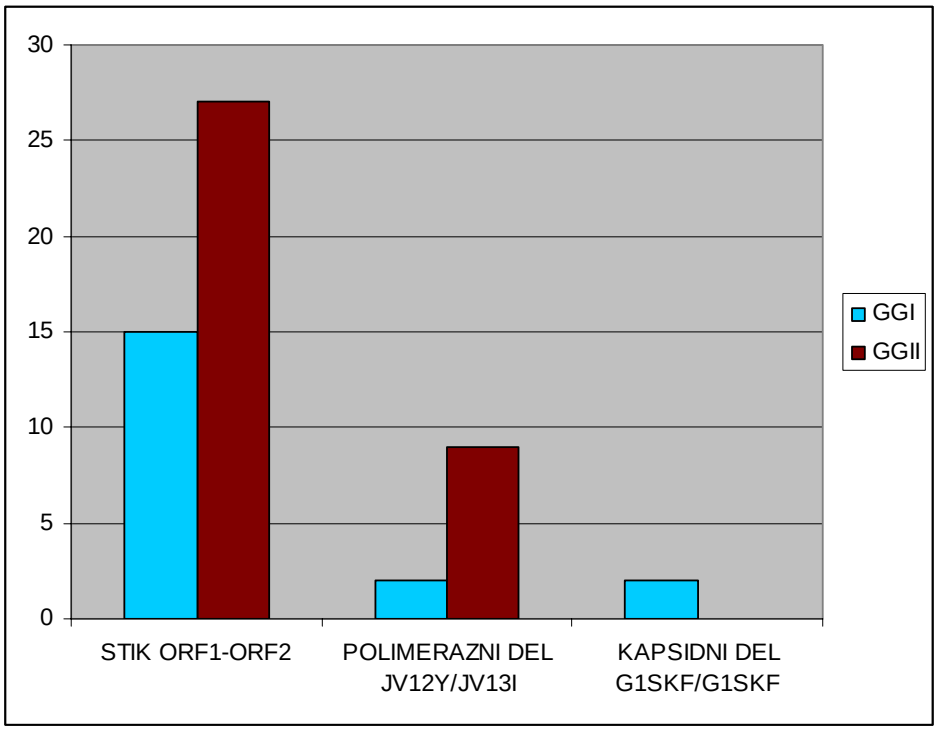


Slika 30: Filogenetsko drevo norovirusnih sevov, pripravljeno po metodi sosedskega odnosa aminokislinskega zaporedja na delu gena RdRp. Referenčni sevi so označeni z znakom ▲, seva iz školjk z znakom ●.

4.3.6 Primerjava ugotovljene norovirusne RNA glede na metode detekcije

Z metodo RT-PCR v realnem času smo ugotovili največ norovirusov pri obeh genskih skupinah, in sicer pri 15 vzorcih gensko skupino I in v 27 vzorcih gensko skupino II.

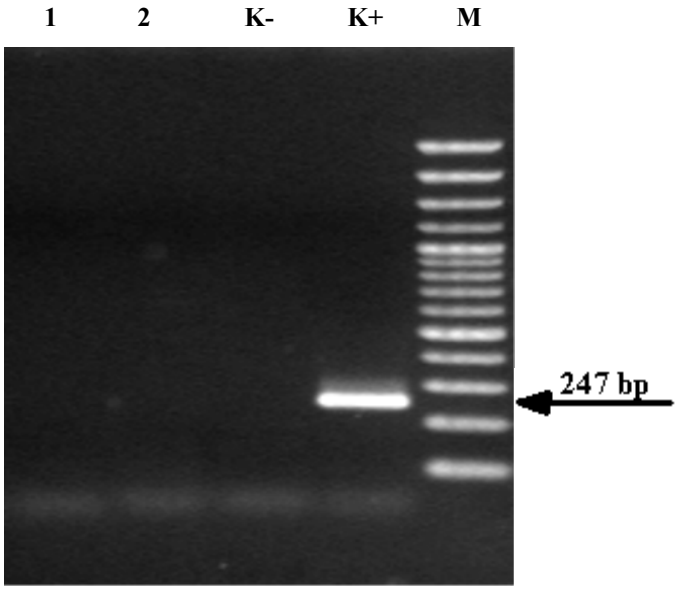
S klasično metodo RT-PCR smo norovirusno RNA ugotovili pri manjšem številu vzorcev. V polimeraznem delu genoma smo pri dveh vzorcih ugotovili gensko skupino I, pri devetih vzorcih pa gensko skupino II (slika 31). Kapsidni del genoma norovirusov iz genske skupine I smo uspešno pomnožili le pri dveh vzorcih, medtem ko pri pomnoževanju genoma genske skupine II v kapsidnem delu genoma nismo dobili čistih sekvenc (slika 31).



Slika 31: Grafična primerjava deležev ugotovljenih norovirusov z različnimi oligonukleotidnimi začetniki po genskih skupinah. Prikazano je število ugotovljenih norovirusov z RT-PCR v realnem času in s klasično metodo RT-PCR.

4.4 Virus hepatitisa A

Izolirano RNA, ki smo jo uporabili v postopkih za ugotavljanje norovirusov, smo uporabili tudi za ugotavljanje virusa hepatitisa A. Z metodo RT-PCR v realnem času in s klasično RT-PCR smo ugotavljali prisotnost virusa hepatitisa A. Pri dveh vzorcih (prosto nabranih klapavic z območja Pirana, 26. 11. 2007, ter iz školjčišča na Debelem rtiču, 10. 7. 2008) smo dobili vrednost Ct višjo od 40. Reakcijo smo ponovili, vendar sta bila vzorca negativna, medtem ko sta bila oba kontrolna vzorca pričakovano pozitivna oziroma negativna. Oba vzorca smo preiskali tudi s klasično metodo RT-PCR, s katero prav tako nismo dobili pomnožkov, ki bi ustrezali pričakovani velikosti (slika 32).



Slika 32: Primer elektroforetske ločitve produktov pomnoževanja z RT-PCR in začetnimi oligonukleotidi H1/H4; M marker, K - (negativna kontrola), 1-2 vzorca; 1 - Piran; 26. 11. 2007, 2 – Debeli rtič; 10. 7. 2008, K+ (pozitivna kontrola). Velikost pomnožkov je 247 bp.

5 RAZPRAVA

5.1 Bakterija *V. parahaemolyticus*

Bakterija *V. parahaemolyticus* je del običajne morske mikroflore. Patogeni sevi, ki imajo zapis za hemolizine, so v okolju redki (DePaola in sod., 1990). Na število bakterij v morski vodi in tudi v školjkah vplivata predvsem dva dejavnika. To sta temperatura in stopnja slanosti. V naši študiji so bili vzorci školjk, pri katerih smo ugotovili tako gen *toxR* kot gen *tlh*, vzorčeni v poletnih mesecih. Delež pozitivnih vzorcev na posameznih odvzemnih mestih je podoben, kar za tako majhno geografsko področje ni presenetljivo. Pet pozitivnih vzorcev smo ugotovili leta 2006 (dva vzorca iz Strunjana, dva iz Seče in eden z Debelega rtiča), štiri leta 2007 (trije iz Strunjana, eden z Debelega rtiča) in petnajst v letu 2008 (4 iz Strunjana, 5 iz Seče, 5 z Debelega rtiča in en vzorec s področja Pirana) (tabeli 20 in 21). Rezultati kažejo, da se je v tem obdobju delež vzorcev, ki je vseboval *V. parahaemolyticus,* povečal iz 8,1 % na 20,2 %. Kljub temu se virulentni sevi pojavljajo le izjemoma. V vzorcu, odvzetem leta 2007 v Strunjanu, smo z verižno reakcijo s polimerazo ugotovili gen *trh* (tabela 19). Geni, ki so sorodni genu *trh*, so prisotni tudi pri drugih vibrijih in so zelo homologni (Nishibuchi in Kaper, 1995; Gonzalez-Escalona in sod., 2006; Masini in sod., 2007). Med našo študijo smo na selektivnem agarju TCBS ugotavljali tudi druge bakterije, predvsem *V. alginolyticus*, ki je v školjkah pogosto prisotna bakterija. V našem primeru smo gen ugotovili iz obogatitvenega gojišča in bi lahko izviral tudi iz drugih bakterij, na primer iz bakterije *V. alginolyticus*, ki smo jo v naših vzorcih večkrat potrdili s testom API30E.

S poglobljenim spremljanjem pogostnosti bakterije *V. parahaemolyticus* v školjkah lahko ugotovimo, da na uspešnost dokazovanja mikroba v vzorcih vpliva izbira metode. Primerjava mikrobiološke (gojiščne) in molekularne metode, ki so jo izvedli francoski raziskovalci, je dala presenetljive rezultate. Pri 88,0 % vzorcev, pri katerih so z verižno reakcijo s polimerazo (*toxR*) dokazali *V. parahaemolyticus*, kolonij z gojiščno metodo niso izolirali (Rosec in sod., 2009). Z molekularno metodo, detekcijo gena *tlh,* so tudi na Norveškem ugotovili visok delež kontaminiranih školjk. V poletnem obdobju leta 2006 je bil delež 79,0-odstoten (Collin in sod., 2011). Tudi indijski raziskovalci so ugotovili visok delež bakterije z dokazovanjem gena *toxR* v morskih sadežih, in sicer pri 61,6 % (Dileep in sod., 2003).

Francoski raziskovalci, ki prav tako s klasično bakteriološko preiskavo bakterije niso uspeli izolirati, medtem ko je bila z verižno reakcijo s polimerazo potrjena, so razloge pripisali

selektivnim lastnostim agarja. Ta je bodisi preveč selektiven za *V. parahaemolyticus* bodisi premalo za ostalo prisotno mikrofloro (Rosec in sod., 2009).

Na rezultate gojiščnih preiskav lahko vpliva tudi metabolično stanje bakterije. V t. i. stanju VBNC (*angl. viable but nonculturable*) je mikrob metabolično aktiven, vendar nesposoben rasti in razmnoževanja na običajnih gojiščih (Jiang in Chai., 1996), kot je na primer agar TCBS. Bakterija *V. parahaemolyticus* preide v tako stanje pozimi, ko temperatura morja pade med 13 in 15 °C (Kaneko in Colwell., 1975). Prehod v to metabolično stanje povzroči pomanjkanje hranilnih snovi in nizke temperature (Jiang in Chai., 1996).

V preiskovanih vzorcih školjk smo ugotovili bakterijo *V. parahaemolyticus* z metodo PCR v poletnih mesecih, ko so bile temperature morja višje od 17 °C in le v enem primeru (novembra 2007, tabela 21), ko je bila temperatura morja 13 °C. Študije, ki so jih opisali DePaola in sodelavci, so pokazale, da ima ravno temperatura velik vpliv na razmnoževanje bakterije (DePaola in sod., 2000). Te ugotovitve smo potrdili tudi v naši raziskavi. Pri vzorcih školjk, ki smo jih odvzeli pri nizkih temperaturah morja in nacepili na gojišče, je zraslo veliko manj bakterijskih kolonij, tako neposredno na TCBS kot po predhodni obogatitvi. Spomladi in predvsem poleti, ko so temperature dosegle in presegle 20 °C, smo na agarju opazili preraščanje bakterij.

Drug pomemben dejavnik okolja, ki vpliva na preživetje bakterije *V. parahaemolyticus,* je stopnja slanosti morja. Raziskava, ki so jo izvedli v Španiji, je potrdila, da je optimalna slanost za rast in razmnoževanje mikroorganizma 25 ppt (Martinez-Urtaza in sod., 2008).

Podobne ugotovitve navajajo tudi ameriški raziskovalci, ki so leta 2000 poročali o visoki kontaminiranosti školjk z bakterijo *V. parahaemolyticus* pri izmerjeni slanosti od 14,9 do 29,3 ppt (DePaola in sod., 2000). Stopnja slanosti Jadranskega morja na slovenski obali je med 37 in 38 ppt (Rejec Brancelj, 2003) in je podobna slanosti vzdolž italijanske obale in na južni obali Italije (34 ppt) (Cavallo in Stabili, 2002).

V evropskih državah o stopnji kontaminacije školjk z bakterijo *V. parahaemolyticus* poročajo naslednje: na Norveškem so ugotovili prisotnost mikroba pri 10,3 % (Bauer in sod., 2006), v Španiji med letoma 2002 in 2004 pri 12,5 % (Martinez-Urtaza in sod., 2008), v Veliki Britaniji pri 30 % (Wagley in sod., 2008) in v Franciji pri 14 % (Rosec in sod., 2009) preiskanih školjk. Italijanski raziskovalci so v Jadranskem morju leta 1999 potrdili bakterijo pri 1,6 % vzorcev (Ripabelli in sod., 1999) v obdobju od 2001 do 2004 pri 7,83 % (Normanno in sod., 2006) leta 2007 pri 11,6 % (Ottaviani in sod., 2010a) in leta 2008 pri 5,2 % vzorcev (Di Pinto in sod., 2008). Hrvaški raziskovalci poročajo o 5,0-odstotni prevalenci *V.*

parahaemolyticus v školjkah, ki so v prodaji (Topic-Popovic in sod., 2010), nismo pa zasledili poročil o zastrupitvah z omenjeno bakterijo na področju Hrvaške.

Italijanski raziskovalci so ugotovili kar nekaj primerov zastrupitev z bakterijo *V. parahaemolyticus*. Tako so spomladi leta 2007 v morski vodi prvič dokazali pandemski sev O3:K6, in sicer v morski vodi severnega Jadrana (Caburlotto in sod., 2008), poleti istega leta so ga izolirali tudi iz blata bolnika, ki se je zastrupil z uživanjem školjk (Ottaviani in sod., 2008). Leto kasneje so potrdili dva primera zastrupitev s klapavicami v osrednjem delu Italije. Pri enem bolniku je bil vzrok sev O3:K6, pri drugem sev O1:KUT, ki so ga prav tako ugotovili pri okuženih klapavicah iz italijanskega morja (Ottaviana in sod., 2010b).

Predvsem za pandemski sev je značilno, da se hitro širi, kar dokazuje tudi dejstvo, da so ga ugotovili sprva v vodi, le nekaj mesecev kasneje pa so prvič potrdili tovrstno zastrupitev tudi pri človeku (Ottaviani in sod., 2008). V naši študiji smo pri vzorcu iz Strunjana leta 2007 tudi potrdili gen *trh* (tabela 18). Kako je ta sev prišel v morje, je težko določiti, saj predhodnih študij o seroloških in molekularnih karakteristikah teh bakterij nimamo izdelanih ne pri nas in tudi ne v Italiji (Ottaviani in sod., 2010b). Domnevamo lahko, da je vzrok za to usmeritev glavnih morskih tokov. V zajetem preiskovanem obdobju zastrupitev z bakterijo *V. parahaemolyticus* pri ljudeh, ki bi bili povezani z zaužitjem školjk s slovenske obale, nismo zasledili. Ugotavljamo, da kljub prisotnosti bakterije *V. parahaemolyticus* v školjkah Jadranskega morja le redko prihaja do zastrupitev pri ljudeh. Kultura uživanja tovrstne hrane predvideva toplotno obdelavo. Ta preprečuje, da bi se število bakterij namnožilo do take mere, da bi prišlo do zastrupitev pri ljudeh. V večjem delu sveta (Japonska, Kitajska, ZDA), kjer morske sadeže večinoma uživajo surove, tudi bolj pogosto prihaja do okužb z bakterijo *V. parahaemolyticus* (DePaola in sod., 2000; McLaughlin in sod., 2005 WHO, 1999). Kljub temu da smo s klasičnimi bakteriološkimi preiskavami potrdili le manjše število bakterij *V. parahaemolyticus*, je treba upoštevati, da z metodo ne zaznamo vseh tarčnih bakterij. Uspešnost izolacije ovira tudi prisotnost druge mikroflore in sama selektivnost agarjev (Rosec in sod., 2009). Po drugi strani pa z molekularnimi metodami zaznamo bakterijsko DNA, vendar pa s temi metodami določimo tudi mrtve bakterije. Tako smo v naši študiji z metodo PCR ugotovili precej višji delež (14,2 %) bakterije za razliko od klasične preiskave, s katero smo potrdili prisotnost bakterije v 0,6 % (tabela 19). Zelo pomembno je torej, da redno izvajamo nadzor školjk, previdni moramo biti tudi pri pripravi hrane v smislu naknadnega kontaminiranja živila in hlajenja pri neprekinjeni hladni verigi.

5.2 Verotoksična *E. coli*

Mikrobiološka merila za živila, ki jih določa Uredba (ES) št. 2073/2005, za školjke predvideva ugotavljanje števila bakterij *E. coli* kot indikatorja fekalne onesnaženosti. Ugotavljanja posameznih patogenih sevov *E. coli*, podobno kot za druga živila, ne predvideva. Kjer je močno fekalno onesnaženje, lahko pričakujemo tudi določeno stopnjo kontaminacije z VTEC. Možnost močnejše kontaminacije morske vode ter posledično školjk z *E. coli*, tudi s sevi VTEC, je večja ob močnih deževjih, ko narasle reke, ki se izlivajo v morje, prinesejo s seboj večje količine organskih snovi, tudi bakterij. Posebej izpostavljene so obalne vode (Gourmelon in sod., 2006) in školjke, gojene na teh območjih, ki zaradi načina prehranjevanja koncentrirajo v vodi prisotne mikrobe (Guyon in sod., 2000; Kumar in sod., 2001; Kumar in sod., 2004).

Zaradi hitrega razvoja metod izolacije VTEC, ugotavljanja verotoksinov in genov, ki kodirajo njihovo sintezo, je objavljene podatke o kontaminaciji tako govedi, ki predstavljajo njihov glavni rezervoar, kot živil in vode zelo težko primerjati. Ker je sev *E. coli* O157:H7 med VTEC veljal za najpogostejšega povzročitelja težjih oblik obolenj, kot je HUS, se je analitika usmerila predvsem na ugotavljanje tega seva. Razvita in standardizirana (ISO 16654) je metoda izolacije z uporabo imunomagnetnega ločevanja po fazi obogatitve in se uporablja za ugotavljanje *E. coli* O157 v živilih (Scotter in sod., 2000; Ogden in sod., 2001) pa tudi v vzorcih iz okolja (v zemlji) (Hepburn in sod., 2002). Postopek koncentracije je ključnega pomena zaradi nizkega števila VTEC ter množične mikroflore, ki lahko izolacijo ovira. Pogostnost prisotnosti bakterije *E. coli* O157 pri govedu v fecesu variira od 0,2 do 27,8 % (Hussein in Bolinger, 2005). Podatki za Slovenijo v letu 2008 kažejo na prisotnost *E. coli* O157 pri 1,8 % govejega in 0,9 % ovčjega fecesa (VURS, 2010). Pri razmeroma nizki stopnji kontaminacije živali s temi bakterijami je tudi možnost kontaminacije morske vode ter posledično školjk s kontaminiranimi fekalijami majhna. Verjetnost prisotnosti tega seva v živalski populaciji ne moremo izključiti, smo pa z našo raziskavo, v kateri smo na VTEC O157 testirali 39 vzorcev školjk, potrdili, da kontaminacija ni pogosta. Nekaterim avtorjem je VTEC O157 uspelo izolirati tudi iz školjk. V Maroku je Bennani s sodelavci med letoma 2007 in 2008 verotoksigene seve ugotovil pri 1,9 % školjk, med katerimi je bila večina *E. coli* O157:H7 (Bennani in sod., 2011). Francoski avtorji pa so pri testiranju 150 vzorcev ostrig sev izolirali le v enem primeru (Gujon in sod., 2000). V Indiji je Kumar s sodelavci verotoksigene

seve z genom *stx2* ugotovil pri 5 % ladink, vendar prisotnosti seva *E. coli* O157 niso potrdili (Kumar in sod 2001).

Poleg seva *E. coli* O157 okužbe z VTEC povzročajo tudi drugi verotoksigeni sevi (EFSA, 2011b). Po podatkih EFSA je bil v letu 2009 za polovico primerov okužb (51,7 %) odgovoren sev *E. coli* O157, med ostalimi, ki povzročajo HUS, pa so najpogosteje udeleženi O26, 0145, O103 in O111 (EFSA, 2011a). Nabor teh sevov v Evropi se nekoliko razlikuje od nabora najpogosteje udeleženih pri tovrstnih obolenjih v ameriških državah (USDA, 2011). Za ugotavljanje le-teh so razvili predvsem molekularne tehnike ugotavljanja genov, ki kodirajo virulentne dejavnike VTEC (*vtx1, vtx2, eae, ehyA*), in metode za ugotavljanje prisotnosti toksinov (VT1 in VT2). Na ta način ugotavljamo prisotnost bakterij *E. coli*, ki jim genski zapis omogoča izdelavo verotoksinov. V primerih, ko v vzorcu ugotovimo njihovo prisotnost z dodatnim testiranjem, določamo njihove serološke skupine.

V naši raziskavi smo za testiranje školjk na prisotnost verotoksinov uporabili encimskoimunski test Ridascreen ELISA. Testirali smo 85 školjk po obogatitvi. S testom smo pri delni validaciji metode ugotavljanja toksina VT2 preverjali morebiten vpliv sekundarne mikroflore, tako da smo v vzorec dodali tudi bakterijo *P. aeruginosa*. Meja zaznavnosti metode pri vzorcu z dodanimi sekundarnimi bakterijami in brez njih je bila enaka. To dokazuje, da sekundarna mikroflora ni otežila zaznave toksinov. Prisotnosti verotoksinov v školjkah nismo ugotovili. V letih 2006, 2007 in 2008 je bilo po uradnem veterinarskem sistematskem nadzoru 15,0 % (15/100), 15,9 % (11/69) in 28,1 % (16/57) takih vzorcev klapavic s prekoračenim številom *E. coli* (> 230/100 g). Kljub temu da občasno vsebujejo povišano število bakterij *E. coli*, sklepamo, da patogenih sevov oziroma njenih toksinov vseeno ni bilo med njimi.

Goveje meso med živili predstavlja najpomembnejši vzrok okužb za ljudi. V letnem poročilu o zoonozah za obdobje med letoma 2006 in 2008 EFSA poroča o 0,3–1,9-odstotni stopnji kontaminacije govejega mesa v evropskih državah (EFSA, 2010). V Sloveniji je bil delež ugotovljenih bakterij VTEC v živilih v obdobju med letoma 2007 in 2008 0,4–1,0 % (VURS, 2009). Menimo, da so školjke kontaminirane z VTEC v precej nižjem deležu kot goveje meso. Da bi ugotovili stopnjo kontaminacije, bi bilo treba testirati večje število vzorcev. Seveda možnost kontaminacije školjk z VTEC v primeru fekalnih izlivov in gnojenja v priobalnem pasu obstaja. Povečano kontaminacijo školjk z *E. coli* opažamo po obilnejših deževjih (Miossec in sod., 2000; Gourmelon in sod., 2006), ko prihaja do izpiranja tal in

večjega dotoka rek. Tudi testiranja, ki jih izvajamo v sklopu uradnega veterinarskega sistematskega nadzora v školjkah iz slovenskega morja, potrjujejo pogosto zvišano število *E. coli* po obilnem deževju. V času, ko je pritok fekalnih onesnaževalcev močnejši, lahko pričakujemo tudi možnost kontaminacije z VTEC. Te korelacije med številom *E. coli* v morski vodi in prisotnostjo VTEC raziskovalcem (Chapman in sod., 2001; Conedera in sod., 2004; Gourmelon in sod., 2006) ni uspelo dokazati, prav tako je nismo potrdili v naši študiji. Tudi pri ugotovljenih okužbah z VTEC v Sloveniji nismo zasledili podatkov, ki bi nakazovali povezavo okužb z zaužitjem kontaminiranih školjk.

Bakterije si lahko genetski material tudi izmenjujejo. Tako lahko bakterija del genoma sprejme ali izgubi. S temi prenosi se prenašajo tudi zapisi za dejavnike patogenosti, kot je sinteza za Vtx. Pri sevu *E. coli* O157, ki so ga izolirali iz školjk, niso ugotovili genov *vtx* (Gourmelon in sod., 2006). Tudi Karch s sodelavci pri verotoksigeni *E. coli* O157 gena *vtx* ni ugotovil (Karch in sod., 1992), prav tako ne pri sevu, ki je bil izoliran iz blata človeka (Schmidt in sod., 1999).

Zaradi izredno raznolikega nabora bakterijskih sevov *E. coli*, ki so prisotni v naravi, je za ugotavljanje morebitnih patogenih sevov potrebna hitra in zanesljiva diagnostika. Metode izbora so v prvi vrsti molekularne – ugotavljanja dejavnikov patogenosti (geni), ugotavljanje problematičnih seroloških skupin. Pomembna je tudi izolacija, da ugotovimo, ali dejavniki patogenosti res pripadajo tem mikrobom. Izsledki naše raziskave kažejo na nizko stopnjo kontaminacije školjk z *E. coli* O157 oziroma VTEC. Za ovrednotenje tako nizke stopnje kontaminacije bi bilo treba testirati večje število vzorcev na prisotnost najbolj problematičnih serotipov skupine VTEC.

Ob ugotovljeni nizki stopnji kontaminacije školjk v slovenskem morju in tradicionalni kulinariki, ki predvideva kuhanje školjk, lahko sklepamo, da je možnost za okužbo s školjkami relativno majhna. Kljub temu pa školjke predstavljajo občutljivo živilo, saj zaradi načina prehranjevanja v svojem organizmu kopičijo tako bakterije kot viruse ter morske biotoksine, in zato predstavljajo živilo, ki ga je treba obravnavati z veliko stopnjo pazljivosti in ustreznim nadzorom.

5.3 Norovirusi

Školjke sodijo med živila, ki lahko povzročijo okužbo z norovirusi. Prvi podatki o epidemijah, povzročenih z norovirusi, v Sloveniji segajo v leto 2000. Vir okužbe pa praviloma ni bil ugotovljen (Zimšek in sod., 2003; Poljšak Prijatelj in sod., 2001a; Poljšak Prijatelj in sod., 2001b; Poljšak Prijatelj in sod., 2001c; Štrumbelj in sod., 2003; Grmek Košnik in sod., 2007).

Z našo študijo smo želeli ugotoviti, ali so školjke, ki jih gojijo v slovenskem delu Jadranskega morja, kontaminirane z norovirusi, in če so, v kolikšni meri. Z ugotavljanjem sorodnosti sevov izoliranih iz različnih virov smo želeli ugotoviti poti oziroma vzroke kontaminacije školjk ter ugotoviti, ali naše školjke predstavljajo možen oziroma pomemben vir okužb ljudi.

V obdobju od leta 2006 do 2008 smo v analiziranih vzorcih s klasično metodo RT-PCR ugotovili prisotnost norovirusne RNA pri 10,7 % (pri 17 od 168 vzorcev) (tabela 24), z uporabo RT-PCR v realnem času pa pri 16,7 % (tabela 22). Kontaminacijo smo potrdili tako pri gojenih kot pri prosto živečih školjkah. Stopnja kontaminacije klapavic je nižja v primerjavi s podatki italijanskih raziskovalcev (Suffredini in sod., 2011), ki poročajo o 34,4 % kontaminiranosti. Podobne podatke navajajo Francozi, in sicer 35 % (Le Guyader in sod., 2000), pri Špancih pa zasledimo poročila o 53,7 % kontaminaciji (Vilariño in sod., 2009).

Zanimivi so rezultati švedskih raziskav, v katerih so preiskovali klapavice v okolici otoka, ki je 13 km oddaljen od čistilne naprave. Prisotnost norovirusov so ugotovili pri 57,0 % školjk (Nenonen in sod., 2008).

Raziskovalci ugotavljajo, da začne število norovirusnih okužb pri ljudeh naraščati jeseni (v oktobru in novembru). Vrh je običajno dosežen januarja, nato pa se število obolelih zmanjša (Vinjé in sod., 1997; Koopmans in sod., 2000). Po podatkih slovenskih avtorjev pojavljanje norovirusnih okužb pri ljudeh v Sloveniji ni tako sezonsko izraženo kot drugod po Evropi.

Kljub temu je polovica vseh okužb tudi pri nas vezana na hladnejše mesece (Zimšek Mijovski, 2010). V dveinpolletnem obdobju testiranja klapavic, nabranih v vseh mesecih leta, smo norovirusno RNA največkrat ugotovili v školjkah, nabranih v hladnejših mesecih, in le v enem primeru meseca julija (tabeli 23 in 24). O pogostejših pojavih norovirusov v hladnejšem delu leta poročajo tudi tuji avtorji (Le Guyader in sod., 2000; Boxman in sod., 2006; Le Guyader in sod., 2006b). Manjši delež ugotovljenih norovirusov v toplejših mesecih očitno vpliva tudi na nižjo stopnjo obolevnosti ljudi v tem obdobju (Svraka in sod., 2007). K temu

pojavu pripomore v veliki meri hitrejša degradacija virusnih delcev pod vplivom visokih temperatur okolja in delovanja sončnih žarkov (Metcalf in sod., 1995).

Za izolacijo norovirusov predstavljajo školjke zelo zahteven matriks. Razlog za to je tako v prisotnosti inhibitornih snovi (Beuret in sod., 2003) v tkivih školjk kot v nizki koncentraciji virusov. Pomemben dejavnik je tudi velika genetska raznolikost sevov (Wilson, 1997).
Vse to močno vpliva na zanesljivost dokazovanja virusnih nukleinskih kislin v vzorcih. Iz tkiva školjk smo zato v postopku izolacije želeli učinkovito izolirati čim bolj čisto virusno nukleinsko kislino in hkrati odstraniti inhibitorje, ki ovirajo postopek potrjevanja z metodo PCR v realnem času. Da bi kljub nizkim koncentracijam izboljšali učinkovitost izolacije, smo uporabili homogenat prebavnih žlez školjk. Po izsledkih Schwaba in sodelavcev (Schwab in sod., 1998) se namreč norovirusi, tako kot večina humanih enteričnih virusov, nahajajo predvsem v prebavnih žlezah školjk. To tkivo vsebuje praviloma tudi manj inhibitornih snovi kot ostala tkiva (Le Guyader in sod., 2000).
Referenčnih metod za dokazovanje norovirusov v Evropi še nimamo predpisanih, saj so postopki še v fazi validacij. V naši študiji smo uporabili komercialno dostopne teste za izolacijo RNA. Na tržišču so številni testi namenjeni izolaciji nukleinskih kislin iz različnih matriksov. Njihova prednost je, da je uporaba enostavna in so časovno manj zamudni. V preliminarni študiji smo izolacijo izvajali s testoma RNeasy® Plus Mini Kit, (Qiagen, Nemčija) in Purelink DNA/RNA Kit (Invitogen™, ZDA), v nadaljevanju pa glede na kakovost izolacije izbrali najprimernejšega. Kakovost izolacije smo ugotavljali z merjenjem koncentracije nukleinskih kislin (RNA, DNA in proteinov). Najvišje koncentracije, čistost RNA in nizke vsebnosti proteinov smo dosegli s paketom RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija).
Izvedli smo primerjavo uspešnosti ugotavljanja norovirusov z uporabo dveh metod: klasične RT-PCR in RT-PCR v realnem času. Višji delež kontaminiranih školjk smo ugotovili z drugo metodo (slika 31). Razlika v uspešnosti je bila pričakovana, saj je metoda RT-PCR v realnem času bolj občutljiva kot klasična metoda RT-PCR (Trujillo in sod., 2006). Poleg izbranih začetnih oligonukleotidov pri tej metodi uporabljamo tudi specifično lovko (TaqMan), ki prepozna tarčno zaporedje. Ravno z oligonukleotidnimi začetniki (tabela 12), ki nalegajo na stiku ORF1-ORF2 (Kageyama in sod., 2003), smo norovirusno RNA ugotovili pri največjem številu vzorcev (slika 31), saj je ta del norovirusnega genoma tudi najbolj ohranjen (Katayama in sod., 2002).

Zaradi genetske raznovrstnosti norovirusov je težko razviti univerzalne začetne oligonukleotide, ki bi prepoznali vse možne seve. Večino le-teh pa jih nekateri le zaznajo (Jothikumar in sod., 2005; Le Guyader in sod., 1996b; Richards in sod., 2004; Vinjé in sod., 1996).

S klasično metodo RT-PCR smo z oligonukleotidnimi začetniki, ki nalegajo v polimerazni regiji (Vennema in sod., 2002), ugotovili nekoliko manj norovirusov kot z RT-PCR v realnem času (slika 31), vendar več kot z oligonukleotidnimi začetniki, ki nalegajo v kapsidni regiji (tabela 24). V kapsidni regiji smo sekvence pomnožili le pri dveh vzorcih iz genske skupine I (tabela 24), pri pomnoževanju genske skupine II pa čistih sekvenc nismo uspeli dobiti (tabela 24).

Naša študija potrjuje, da z izborom oligonukleotidnih začetnikov, ki nalegajo v polimerazni regiji, ugotovimo različne genske skupine, genotipe in različice genotipov (tabela 24). Čeprav klasifikacija norovirusov temelji na karakterizaciji kapsidnega gena na ORF2 (Vinjé in sod., 2004), z detekcijo krajšega RdRp fragmenta na ORF1 in sekvenčno analizo teh pomnožkov lahko preučujemo značilnosti norovirusnih sevov (Ike in sod., 2006; Reuter in sod., 2006; Lindell in sod., 2005; Vinjé in sod., 2003).

Pri nekaterih sevih (tabela 24) smo pri sekvenčni analizi pomnožkov v polimeraznem in kapsidnem delu na posameznih mestih opazili prisotnih več različnih nukleotidov. Te sekvence smo označili za mešane (slika 24). Za točno določanje teh sekvenc bi morali izvesti dodatne postopke kloniranja.

Zaradi zelo nizkih količin norovirusne RNA v školjkah je večinoma tudi produkta pomnoževanja zelo malo, zato se pogosto zgodi, da ne moremo določiti nukleotidnega zaporedja (Le Guyader in sod, 2000). V nekaterih testiranih vzorcih (tabela 24) smo na gelu sicer zaznali produkt reakcije RT-PCR, vendar ga je bilo premalo za uspešno sekvenčno analizo (primer vzorca iz Seče 30. 1. 2008, slika 27).

Iz primerjave sekvenc ugotavljamo podobnost med različnimi sevi, na podlagi katere lahko v posameznih primerih sklepamo na izvor oziroma poti okužbe.

Okužbe pri ljudeh največkrat povzročajo norovirusi iz genske skupine II (Koopmans in sod., 2003). Po podatkih Verhoefa in sodelavcev prevladuje genotip II.4 (52 %) , sledi genotip II.b (13 %) in genotip II.7 (6 %) (Verhoef in sod., 2010). Tudi v površinskih vodah in izvirih pitne vode v Sloveniji so bili od enteričnih virusov norovirusi genetske skupine II najpogosteje zastopani, in sicer v 41,3 % (26/63), sevi genske skupine I pa v 33,3 % (21/63) (Steyer in sod., 2011). V naši študiji smo v klapavicah največkrat ugotovili noroviruse genotipa II.4, in sicer pri 8 od 168 vzorcev, kar predstavlja 4,8 %. Vsi izolirani sevi so bili humanega izvora. V

gensko skupino II uvrščamo tudi prašičje noroviruse, vendar pri sevih, izoliranih iz klapavic, podobnosti z živalskimi sevi nismo ugotovili.

Norovirusi so v smislu genetske raznolikosti hitro spreminjajoča se skupina. V ZDA se je leta 1995 pojavila genska različica genotipa II.4 in tam povzročila 55 %, na Nizozemskem pa kar 85 % vseh norovirusnih okužb (Vinjé in sod., 1997). Leta 2004 je bil v Evropi, Avstraliji in Aziji najpogostejši sev Hunter, genska različica genotipa II.4 (Bull in sod., 2010). Dve leti kasneje sta ga nasledila seva Laurens (genska različica 2006a) in Minerva (genska različica 2006b), ki sta se pojavljala tako v Evropi kot v ZDA (Siebenga in sod. 2008; Kroneman in sod., 2006). Med našimi izolati smo tudi ugotovili tri genske različice genotipa II.4 (2006a, 2006b in 2008), ki so prikazani v tabeli 24.

Sev DRT/2008/SI, ki smo ga izolirali iz školjk na Debelem rtiču, smo po kriteriju ujemanja v nukleotidnem zaporedju z referenčnim sevom II.b (Vannes) umestili v genotip II.b (slika 28). Aminokislinsko zaporedje izoliranega seva je med referenčnima sevoma Hawai (genotip I.2) in Vannes (II.b) zelo podobno, z obema se ujema v 98,9 % (priloga 2). Italijanski raziskovalci so za razlikovanje med genotipoma II.4 in II.b predstavili metodo določanja polimorfizma dolžine restrikcijskih odsekov (RFLP, *angl. restriction fragment lenght polymorphism*), ki se je po prvih podatkih izkazala kot dokaj specifična in občutljiva (Ramirez in sod., 2008). V kasnejših objavah (Ramirez in sod., 2009) so ugotovili, da zaradi številnih točkovnih mutacij v genomu norovirusov deleža krožečih sevov ne prepozna.

Genotip II.b se je pojavil leta 2000 v Franciji, ko je prišlo do množične hidrične zastrupitve ljudi (Gallay in sod., 2006). Sevi genotipa II.b so se nato pojavljali na Nizozemskem, Danskem, Švedskem, v Italiji in Belgiji (Koopmans in sod., 2003). Raziskovalci opisujejo, da so sevi genotipa II.b nastali kot posledica genskih rekombinacij, pri katerih je polimerazni gen skupen, v kapsidnem delu pa se pojavljajo različne variacije (Ambert-Balay in sod., 2005; Reuter in sod., 2005). Sev povzroča predvsem obolenja pri otrocih. Ti zbolijo za gastroenteritisom.

V letih 2005 in 2006 so pri obolelih otrocih zaradi norovirusnih gastroenteritisov v Italiji največkrat ugotavljali genotip II.4 (v 81,0 %), drugi najpogostejši je bil II.b (v 14,0 %), tretji pa genotip I.1 (v 5,0 %) (Ramirez in sod., 2009).

V naši raziskavi smo poleg že omenjenega genotipa II.4 (v 4,8 %) določili še genotipe II.b, I.1, I.2 in I.3 (tabela 24).

Vzorci, pri katerih smo ugotovili norovirusno RNA, so najpogosteje izvirali iz školjčišča na Debelem rtiču. Razlog za to bi lahko bila lokacija tega školjčišča, saj leži izmed vseh školjčišč na najbolj severni točki, kamor teče glavni morski tok. Vzrok za višjo stopnjo kontaminacije

lahko pripišemo tudi intenzivnemu ladijskemu prometu na tem področju in izpustom odpadnih voda ter izlivom rek. Našteti dejavniki bi lahko bili prav tako vzrok genetski raznolikosti norovirusov, ugotovljenih na tem področju. Pri sevih, določenih v slovenskih školjkah, smo s sekvenčno analizo ugotavljali 100-odstotno ujemanje na nukleotidnem nivoju s sevi, ki so jih izolirali drugod po svetu (slika 28 in priloga 2). Ta ugotovitev nakazuje vpliv intenzivnega mednarodnega pomorskega transporta oziroma na posledice globalizacije tudi na morski mikroekosistem. Prav tako smo v školjkah z Debelega rtiča ugotavljali gensko identične seve v različnih časovnih obdobjih vzorčenja (slika 32), kar kaže na daljše zadrževanje določenega seva na lokaciji, oziroma kontaminacijo z identičnim virusnim sevom v obeh obdobjih vzorčenja. Z verižno reakcijo s polimerazo smo zaznali le virusno RNA norovirusov, nismo pa ugotovili, ali so virusi dejansko živi in tudi sposobni povzročiti okužbo. Norovirusov ne moremo gojiti na celičnih kulturah, zato so se uveljavile molekularne metode kot najbolj učinkovite za dokazovanje norovirusov. Izsledke različnih študij, pri katerih so uporabili različne metode izolacije RNA in postopke za molekularno dokazovanje pa tudi težko primerjamo.
Ugotovili smo tudi veliko podobnost med sevi, dokazanimi v klapavicah, in sevi, ki so bili izolirani iz izvirov pitne vode, površinskih voda in izolatov iz blata obolelih ljudi na področju Slovenije. Stopnja identičnosti v nukleotidnem zaporedju je bila do 95 % (priloga 3), v aminokislinskem zaporedju pa tudi 100 % v (priloga 4).

Z rezultati naše raziskave smo v triletnem raziskovalnem obdobju dobili preliminarne podatke o kontaminiranosti slovenskih klapavic z norovirusi. Glede na to, da smo v klapavicah potrdili različne genotipe norovirusov, bi za širši vpogled v pogostnost pojavljanja posameznih sevov prav gotovo morali spremljati pojavljanje norovirusov skozi daljše časovno obdobje. Predhodna študija o kontaminaciji klapavic z norovirusi je bila v Sloveniji izvedena v obdobju od leta 2004 do pomladi leta 2006, vendar v tem času norovirusi v školjkah niso bili dokazani (Mihorič, 2007).

Zaradi svojega načina prehranjevanja so školjke pogosto kontaminirane z norovirusi, kar smo z našo študijo tudi ugotovili. Bistveno večjo nevarnost za okužbo predstavlja uživanje surovih školjk. Glede na to, da kulinarični običaji pri nas predvidevajo termično obdelavo klapavic, je možnosti za pojav tovrstnih obolenj manj. Drugačno sliko bi pričakovali pri ostrigah, ki se praviloma uživajo surove.

5.4 Virus hepatitisa A

Virus hepatitisa A se med ljudmi najpogosteje prenaša kontaktno (Yong in Son, 2009), med vzroki okužb povezanih s hrano pa so najpogosteje kontaminirane školjke (Richards, 1985; Cliver, 1985). Le-te s svojim načinom prehranjevanja koncentrirajo v vodi prisotne viruse in so potencialni vir okužb pri ljudeh (Sanchez in sod.,2002; Shieh in sod., 2007). V literaturi najdemo številne podatke o izbruhih obolenj, ki so povezani z uživanjem kontaminiranih školjk z virusom hepatitisa A (Halliday in sod., 1991; Conaty in sod., 2000; Sanchez in sod., 2002, Richards, 1985; Rippey, 1994; Bostock in sod., 1979; Sockett in sod., 1993; Apaire-Marchais in sod., 1995). Glede na pogostnost pojavljanja tovrstnih obolenj po svetu smo hipotetično predpostavili, da bomo tudi v naši raziskavi ugotovili prisotnost virusa v školjkah.
Virus hepatitisa A preživi v okolju (zemlji, morski vodi, površinah) in v školjkah daljše obdobje, lahko tudi več mesecev (Bosch, 1995; Sobsey in sod., 1989). Zaradi težavnega gojenja na celičnih kulturah se za ugotavljanje tudi tu najpogosteje uporabljata metodi RT-PCR v realnem času in klasična metoda RT-PCR. Ti dve metodi smo uporabili tudi v naši študiji.
Tudi ta virus je v školjkah pogosto prisoten v nizkih koncentracijah (Atmar in Estees, 2001), zato je za zanesljivo diagnostiko pomembna ekstrakcija virusne nukleinske kisline s čim manj prisotnimi inhibitorji. Izolacijo virusne RNA smo izvajali s komercialnim testom RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija), ki se je med tremi testi izkazal za najbolj učinkovitega. Postopek izolacije RNA virusa hepatitisa A z gvanidinijevim izotiocianatom se je tudi v primerjavi s postopki izolacije s TRIzolom, siliko in proteinazo K iz blata obolelih ljudi izkazala za najuspešnejšo (de Paula in sod., 2003). Uhrbrandova s sodelavci je primerjala pet postopkov ekstrakcije virusne RNA iz školjk (Uhrbrand in sod., 2010). Ugotovila je, da je najprimernejša nekoliko modificirana metoda, ki jo je opisal Jothikumar (Jothikumar in sod., 2005) in predvideva izolacijo s posebnimi magnetnimi delci; preiskavo so opravili s komercialnim testom NucliSENS miniMAG (BioMerieux, Herlev, Danska).
Z oligonukleotidnimi začetniki smo pomnoževali kapsidni odsek virusnega genoma (VP1), tako z RT-PCR v realnem času kot s klasično metodo RT-PCR. Pomnoževanje tega odseka se uporablja tako za detekcijo kot za karakterizacijo virusnih sevov hepatitisa A (Arauz-Ruiz in sod., 2001).
Dva vzorca, pri katerih smo pomnoževali nukleinsko kislino z RT-PCR v realnem času, smo ocenili za pogojno pozitivna, vendar tega s ponovnim pomnoževanjem virusne RNA nismo uspeli potrditi.

V preteklosti so bili v južnem delu Italije ugotovljeni številni primeri zastrupitev s školjkami, ki so bile kontaminirane z virusom hepatitisa A (Chironna in sod. 2002; Croci in sod., 1999; Macaluso in sod., 2006; Suffredini in sod., 2008). Način uživanja školjk v Italiji pogosto ne predvideva toplotne obdelave, kar še dodatno pripomore k tveganju okužbe. Zakonodaja v EU, ki uvršča školjke v kategorijo A, predvideva prodajo na trg brez predhodnih postopkov očiščevanja in sem se uvrščajo tudi školjčišča v Italiji. Školjke pa so kljub tej kategorizaciji lahko kontaminirane z virusom hepatitisa A (Dore in sod., 2010; Maalouf in sod., 2010). Zelo nazoren je primer iz Portugalske: V školjkah, ki so izpolnjevale najstrožje kriterije glede števila *E. coli* (kategorija A), so ugotovili kar 33-odstotno kontaminacijo z virusom hepatitisa A (Mesquita in sod., 2011). Po podatkih iz literature lahko vidimo, da prisotnost virusa v školjkah lahko variira. Tako španski raziskovalci v gojenih in prostoživečih klapavicah v letu 2002 poročajo o 27,5-odstotni kontaminaciji z virusom hepatitisa A (Romalde in sod., 2002), medtem ko v raziskavi, ki je bila opravljena na istem področju leta 2005 (vzorčenje je bilo opravljeno mesečno, čez vse leto), virusa v školjkah niso ugotovili (Vilariño in sod., 2009). Stopnja kontaminacije z virusom hepatitisa A se v školjkah razlikuje tudi glede na okolje rastišč, kar dokazujejo izsledki francoskih raziskovalcev. V gojenih ostrigah virusa niso ugotovili, medtem ko je bila kontaminacija v ostrigah iz področij, ki niso bila namenjena gojenju, osemodstotna (Le Guyader in sod., 2000). Klapavice, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, so izhajale tako iz školjčišč kot iz prostih nahajališč (tabela 4), vendar v obeh primerih virusa hepatitisa A nismo potrdili.

Slovenija sodi med dežele z najnižjim deležem obolelih za hepatitisom A. Tako jo uvršča tudi Evropski center za nadzorovanje in preprečevanje bolezni (ECDC). Okužbe se v Sloveniji pojavljajo le občasno (ZZV, 2009). Tudi med našo študijo (2006−2008) je bila incidenca bolezni v Sloveniji nizka (0,5–0,8/100 000), medtem ko je bila v Italiji bistveno višja (1,5–2,3/100.000) (ECDC, 2010).

6 SKLEPI

- V klapavicah iz slovenskega morja smo ugotovili prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus* ter *E. coli* in norovirusov, medtem ko virusa hepatitisa A nismo potrdili.

- Med bakterijami *E. coli* nismo ugotovili verotoksičnih sevov, prav tako ne verotoksinov. Pri testiranju klapavic z encimskoimunskim testom ELISA (Verotoxin, Ridascreen, Nemčija) smo testirali tudi vpliv sekundarne mikroflore in ugotovili, da le-ta v našem testu ni vplivala na mejo zaznavnosti.

- Dejstvo, da verotoksičnih bakterij *E. coli* in verotoksinov nismo dokazali, stopnja kontaminacije školjk z *E. coli* (> 230/100 g mesa in tekočine školjk) pa je variirala od 15,0 % leta 2006, 15,9 % leta 2007 do 28,1 % leta 2008, potrjuje, da bakterijski kazalci fekalne kontaminacije niso hkrati tudi pokazatelj prisotnosti patogenih sevov *E. coli*.

- Bakterijo *V. parahaemolyticus* smo s klasično bakteriološko preiskavo izolirali le iz enega vzorca (0,6 %) klapavic. Vrstno specifična gena *toxR* in *tlh* smo dokazali pri 14,2 % predobogatitvenih vzorcih, tudi pri tistih, kjer s klasično mikrobiološko metodo bakterijskih kolonij nismo uspeli izolirati.

- Pri testiranju treh različnih komercialnih testov (PureLink™ Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen, ZDA), PureLink™ Viral RNA/DNA Kit z dodanim postopkom prečiščevanja s TRIzolom in RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija), s katerimi smo testirali učinkovitost izolacije virusne RNA iz vzorcev školjk, se je kot najustreznejši izkazal test RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija).

- S klasično metodo RT-PCR, s katero smo pomnoževali del norovirusnega gena za RNA odvisne polimeraze RNA (RdRp), smo dokazali noroviruse pri 10,7 % vzorcev školjk.

- Z metodo RT-PCR v realnem času smo pomnoževali odsek med ORF1-ORF2, ki je v genomu norovirusov najbolj ohranjen. S to metodo smo dokazali prisotnost norovirusne RNA pri 16,7 % pregledanih vzorcev.

- Norovirusno RNA smo v preiskovanem obdobju največkrat ugotovili v školjkah iz školjčišča na Debelem rtiču (v 27,5 %), manj pogosto v školjkah iz Strunjana (19,6 %) in najmanj v školjkah iz Seče (7,0 %). V prostoživečih klapavicah je bila kontaminacija 33 % (2/6).

- Z vzorčenjem tekom triletnega obdobja smo kontaminacijo klapavic z norovirusi ugotovili največkrat v zimskih mesecih, tako v školjčiščih kot v prostih nahajališčih.

- Norovirusni sevi dokazani v školjkah so najpogosteje pripadali genotipu II.4 (različica 2006b), ki je najpogosteje prisoten tako v Sloveniji kot drugod po svetu tako pri ljudeh z gastroenteritisom kot v izvirih pitne vode in v površinskih vodah.

- Z analizo nukleotidnih zaporedij na ORF1 smo na nukleotidnem nivoju ugotovili tudi 100-odstotno ujemanje norovirusnih sevov s sevi, ki so jih izolirali tudi drugod po svetu.

7 POVZETEK

Gojenje klapavic je v veliki meri povezano z vplivi okolja. Pomembna so gibanja morskih tokov, temperaturna nihanja morja, ob tem pa še številni drugi dejavniki, ki so rezultat različnih človeških posegov. Zaradi svojevrstnega prehranjevanja, tj. precejanja vode, školjke v svojem telesu poleg hranil kopičijo tudi številne mikroorganizme.

V obdobju od leta 2006 do leta 2008 smo v mediteranskih klapavicah (*M. galloprovincialis*), ki jih v Sloveniji gojimo na treh lokacijah: v Seči, Strunjanu in na Debelem rtiču, ugotavljali prisotnost bakterije *V. parahaemolyticus*, norovirusov in virusa hepatitisa A, v obdobju od leta 2007 do 2008 pa tudi prisotnost bakterije VTEC in njenih toksinov (VT1 in VT2). V študijo smo vključili tudi manjše število prosto nabranih klapavic s področja Pirana.

Med povzročitelji nalezljivih bolezni pri ljudeh smo v klapavicah ugotovili bakterijo *V. parahaemolyticus* in noroviruse. Virusa hepatitisa A v naši študiji nismo potrdili. Bakterija *V. parahaemolyticus* je del običajne morske mikroflore, vsebnost bakterij *E. coli* v vodi pa nakazuje na fekalno kontaminacijo.

Bakterije *E. coli* so v klapavicah slovenskega morja prisotne, kar z izvajanjem rednega nadzora tudi spremljamo. Razvoj analitike smo usmerili predvsem v ugotavljanje najpogostejšega povzročitelja obolenj pri ljudeh, v dokazovanje serotipa O157:H7. Pri testiranju vzorcev klapavic, ki smo jih preiskali z imunsko magnetnim ločevanjem in cepitvijo na selektivna gojišča (po ISO/TS 16649-3:2005), seva O157:H7 nismo ugotovili. Najpomembnejša patogena dejavnika bakterije *E. coli* sta toksina VT1 (Stx1) in VT2 (Stx2). Z encimskoimunskim testom ELISA (Ridascreen, Nemčija) smo testirali tudi vpliv sekundarne mikroflore in ugotovili, da le-ta v našem testu ni vplivala na mejo zaznavnosti. V preiskanih vzorcih verotoksinov nismo ugotovili. Glede na to, da so glavni rezervoar bakterij VTEC prežvekovalci, sklepamo, da obalna področja niso obremenjena z izpusti fekalij s kmetijskih zemljišč.

V klapavicah nismo ugotovili bakterije VTEC in prisotnosti verotoksinov, stopnja kontaminacije školjk, ki so vsebovale povišano število *E. coli* (> 230/100 g mesa in tekočine školjk) pa je variirala od 15,0 % leta 2006, 15,9 % leta 2007 do 28,1 % leta 2008. To nam potrjuje, da bakterijski kazalci fekalne kontaminacije niso hkrati pokazatelj prisotnosti patogenih sevov *E. coli*.

Bakterijo *V. parahaemolyticus* smo s klasično bakteriološko preiskavo izolirali le iz enega vzorca (0,6 %) klapavic. Vrstno specifična gena *toxR* in *tlh* smo dokazali pri 14,2 % predobogatitvenih vzorcih, tudi pri tistih, kjer s klasično mikrobiološko metodo bakterijskih kolonij nismo uspeli izolirati. Predobogatitveni bujon smo testirali tudi na prisotnost hemolizinov (TDH in TRH). V enem vzorcu (0,6 %) iz školjčišča Strunjan smo poleg vrstno specifičnih genov – *tlh* in *toxR*, detektirali tudi gen za hemolizin (*trh*). Glede na dokazana vrstno specifična gena smo sklepali, da gen pripada bakteriji *V. parahaemolyticus*. Pri tem moramo upoštevati dejstvo, da imajo tudi drugi predstavniki tega rodu (na primer *V. alginolyticus*, ki smo ga v preiskovanih vzorcih školjkah tudi ugotovili) zelo homologne gene (Gonzalez-Escalona in sod., 2006; Masini in sod., 2007).

Trenutno so postopki za ugotavljanja norovirusov in virusa hepatitisa A še v razvoju, zato smo izbrali tri različne komercialne teste (PureLink™ Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen, ZDA), PureLink™ Viral RNA/DNA Kit z dodanim postopkom prečiščevanja s TRIzolom in RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija), s katerimi smo testirali učinkovitost izolacije virusne RNA iz vzorcev školjk. V nadaljnjih študijah smo kot najustreznejšega izbrali test RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija). Noroviruse smo določevali z RT-PCR v realnem času in klasično metodo RT-PCR. Z metodo RT-PCR v realnem času smo pomnoževali odsek med ORF1-ORF2, ki je v genomu norovirusov najbolj ohranjena regija (Katayama in sod., 2002). Prisotnost norovirusne RNA smo ugotovili pri 16,7 % pregledanih vzorcev. S klasično metodo RT-PCR smo pomnoževali del gena za RNA odvisne polimeraze RNA (RdRp). Ta test je bil manj občutljiv, saj smo z njim dokazali noroviruse le pri 10,7 % vzorcev školjk. Noroviruse smo v preiskovanem obdobju največkrat ugotovili v školjčišču na Debelem rtiču (v 27,5 %), manj pogosto v Strunjanu (19,6 %) in v Seči (7,0 %). Zaradi majhnega števila vzorcev prostoživečih školjk virusne kontaminacije le-teh ne moremo realno oceniti. Ob dobljenih rezultatih lahko ugotovimo 33-odstotno kontaminacijo (2/6). Z vzorčenjem tekom triletnega obdobja smo kontaminacijo klapavic z norovirusi ugotovili največkrat v zimskih mesecih, tako v školjčiščih kot v prostih nahajališčih. Seve norovirusov, dokazanih v klapavicah, smo primerjali s sevi, ki so bili dokazani v površinskih vodah, v izvirih pitne vode ter s sevi iz blata ljudi, ki so oboleli za gastroenteritisom v Sloveniji, in skušali najti morebitno povezavo. Sevi iz školjk so najpogosteje pripadali genotipu II.4 (različica 2006b). Ta genotip je tako v Sloveniji (Steyer in sod., 2011) kot drugod po svetu (Kroneman in sod., 2008) najpogosteje dokazan tako pri ljudeh z gastroenteritisom kot v izvirih pitne vode in v površinskih vodah. Dejstvo, da so sevi dokazani v klapavicah in pri ljudeh zelo sorodni,

nakazuje, da so rastišča školjk verjetno kontaminirana z odplakami iz okoliških področij. Školjke, onesnažene z norovirusi, pa predstavljajo potencialen vir za okužbo ljudi. Domnevamo, da je na Debelem rtiču večja pogostost onesnaženja školjk z norovirusi posledica lokacije školjčišča, ki se nahaja v neposredni bližini Luke Koper. V tem delu Jadranskega morja poteka intenziven pomorski promet, veliko je izpustov voda in izlivov rek. Vse to onesnažuje morsko vodo in posledično tudi školjke, ki jih gojijo na tem področju.

Virusa hepatitisa A v klapavicah nismo potrdili z nobeno od uporabljenih metod (RT-PCR v realnem času, klasična metoda RT-PCR). Rezultati naše študije so skladni tudi s podatki o pogostnosti okužb ljudi z virusom hepatitisa A; le-ta je namreč v Sloveniji zelo nizka. Podatki ECDC nas uvrščajo med države z najnižjo stopnjo obolevnosti.

V naši študiji smo prvič pregledali klapavice iz slovenskih školjčišč na prisotnost patogene bakterije *V. parahaemolyticus* in virusov, ki se prenašajo na človeka s kontaminirano vodo in hrano. Ugotovimo lahko, da uživanje školjk iz slovenskega morja predstavlja določeno tveganje za okužbo ljudi, predvsem za okužbo z norovirusi in za okužbo z bakterijo *V. parahaemolyticus*. Zaradi tega je zelo pomembno, da pred uživanjem školjke dobro toplotno obdelamo, saj lahko le na ta način prisotne mikroorganizme uničimo in preprečimo okužbe pri ljudeh. Spremljanje mikrobiološke kontaminacije školjk mora imeti tudi širši družbeni pomen. Opozarjanje odgovornih oseb in širše skupnosti na onesnaženost morja in posledično tudi živil, ki jih pridobivamo iz morja, mora voditi k ustreznim družbenim ukrepom. Treba je zagotoviti ustrezno odstranjevanje odplak, dovoljenje za gojitev školjk pa lahko pridobijo samo urejena in čista morska območja.

8 SUMMARY

Mussel harvesting is closely linked to environmental influences, such as the movement of sea currents, temperature fluctuations, as well as several factors that are the result of various human activities. Due to its unique method of feeding, i.e., filtering of water, shellfish accumulate numerous microorganisms in their bodies, in addition to nutrients.

In our study from 2006 to 2008, Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*) from three harvesting areas in the sea of Slovenia: Seča, Strunjan and Debeli rtič and natural beds in the area of Piran were investigated for the presence of *V. parahaemolyticus*, noroviruses and hepatitis A virus. In 2007 and 2008, mussels were also examined for the presence of verotoxigenic *E. coli* and its toxins (VT1 and VT2). The goal of our study was to determine the level of mussel contamination with bacteria and viruses from harvesting areas and from wild mussels collected along the Slovenian coast.

Among human pathogens, *V. parahaemolyticus* and noroviruses were detected in mussels. Hepatitis A virus was not confirmed in our study. *V. parahaemolyticus* is a part of normal marine flora, while *E. coli* bacteria in the water indicates faecal contamination.

The results of the surveillance and monitoring program in Slovenia prove that *E. coli* is present in mussels. Development of analytical methods has focused primarily on identifying the most common *E. coli* serotype causing disease in humans, O157: H7. In our study, samples of mussels were tested using immuno-magnetic separation and seeding on a selective medium (ISO / TS 16649-3:2005) but the strain was not found. The most important *E. coli* pathogenic factors are toxins VT1 (Stx1) and VT2 (Stx2). We tested samples of mussels with the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA (Ridascreen, Germany) for the presence of toxins and also studied the effect of secondary microflora. We found that this did not affect the detection limit but verotoxins were not detected in the examined samples. Given that ruminants are the main reservoir of VTEC bacteria, we concluded that coastal areas are not burdened with the release of faecalia from farming areas.

VTEC and its toxins were not detected in mussels, while the degree of total *E. coli* contamination with > 230 MPN/100 g shellfish meat and liquid during these three years ranged from 15.0 % in 2006, 15.9 % in 2007 to 28.1 % in 2008. Our study also confirmed that bacterial indicators of faecal contamination are not a reliable indicator of the presence of *E. coli* pathogenic strains. That also indicates that the number of *E. coli* is not a reliable indicator of pathogenic strains. The bacteriological method only detected *V. parahaemolyticus* in one sample (0.6 %). Species-specific genes – *tlh* and *toxR* were detected in 14.2 % of samples,

even in samples in which bacteria was not isolated by classical microbiological methods. Samples from the enrichment broth were further tested for the presence of hemolysins (TDH and TRH) by PCR. The hemolysin gene (*trh*) was detected in one sample from a harvesting area (Strunjan). We assumed that the detected gene belonged to the bacteria *V. parahaemolyticus* but it should be noted that other representatives of this genus (*V. alginolyticus*) have highly homologous genes (Gonzalez-Escalona et al., 2006, Masini et al., 2007).

Since we do not yet have standardized protocols for the detection of noroviruses and hepatitis A virus, we isolated viral RNA with commercial assays (PureLink ™ viral RNA / DNA Kit (Invitrogen, USA), PureLink ™ viral RNA / DNA Kit with added purification procedure with TRIzolom and RNeasy ® Plus Mini Kit (Qiagen, Germany)), and tested the efficiency of the isolation of RNA from the samples of mussels. In subsequent studies, we used the most appropriate assay for our purposes - RNeasy ® Plus Mini Kit (Qiagen, Germany).

Noroviruses were detected by real-time RT-PCR and RT-PCR methods. Real-time RT-PCR amplified the ORF1-ORF2 junction, since this part of the genome is highly conserved (Katayama et al., 2002). The presence of the norovirus RNA was detected in 16.7 % of the examined samples. RT-PCR amplified a specific product of the short part of the gene for RNA dependent RNA polymerase (RdRp). This method was not as efficient as the former, since only 10.7 % of contaminated samples were detected.

During the period of our investigation, noroviruses were most frequently found in the harvesting area of Debeli rtič (27.5 %), slightly less in Strunjan (19.6 %) and in Seča (7.0 %). Because of the small number of wild mussel samples, it is difficult to evaluate the exact degree of contamination. Our results indicate 33 % contamination of mussels (2/6). Mussel sampling during the three-year period showed norovirus contamination mainly in winter months, both in shellfish harvesting areas and among free living mussels. Strains detected from mussels were compared to strains that have been isolated from surface waters, springs of water and from people in Slovenia suffering from gastroenteritis, in order to identify a possible connection.

The strains isolated from mussels most often belong to genotype II.4 (subgenotype 2006b). This genotype is also found most often both in Slovenia (Steyer et al., 2011) and worldwide (Kroneman et al., 2008) in humans with gastroenteritis and also in drinking water springs and surface waters (Steyer et al., 2011). The fact that strains isolated from Mediterranean mussels and in humans were related indicates that mussel harvesting areas are probably contaminated with sewage from the surrounding area. Shellfish contaminated with noroviruses are a

potential source of human infection. We assume that one of the reasons for the higher level of norovirus contamination of mussels in Debeli rtič is the location of the harvesting area itself, in proximity to Luka Koper. Dense shipping is present in this part of the Adriatic Sea, as well as effluent from rivers and streams. All this contributes to the pollution of the sea and, consequently, also shellfish.

Hepatitis A virus in mussels was not confirmed by any of the methods used (RT-PCR, real-time, classical RT-PCR). The results of our study are also confirmed by data of the frequency of human infection with the hepatitis A virus, which is low in Slovenia. Data from ECDC classified our country as one of the countries with the lowest morbidity.

In our study, we first examined mussels from shellfish harvesting areas in Slovenia for the presence of the pathogenic bacteria *V. parahaemolyticus*, verotoxic *E. coli* and viruses that are transmitted to humans through contaminated water and food. It should be noted that the consumption of shellfish from Slovenian coastal waters carries a certain risk of human infection, particularly infection with noroviruses and *V. parahaemolyticus*. It is therefore very important that the mussels undergo a heating process before consumption, because this is the only way to destroy the microorganisms present and prevent infections in humans. Monitoring the microbial contamination of shellfish has social significance. Alerting responsible persons and the wider community about pollution of the sea and, consequently, food obtained from the sea, should lead to appropriate social measures. It is necessary to ensure proper disposal of sewage, and shellfish harvesting areas should only be located in organized and clean marine areas.

9 ZAHVALA

Školjke so delikatna jed.

Priprava se zdi dokaj enostavna. Potrebujemo le izbrane sestavine, začimbe in dober recept. Dobri kuharji stresajo domisli iz rokava, jaz sem pri tej jedi dodala le začimbico. Zahvaljujem se vsem, ki ste mi pri tem pomagali.

10 LITERATURA

Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, et al. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. J Clin Microbiol 1995; 33: 973–7.

Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. J Infect Dis 1969; 119: 668–73.

Ambert-Balay K, Bon F, Le Guyader F, et al. Characterization of new recombinant noroviruses. J ClinMicrobiol 2005; 43: 5179–86.

Andlovic A. Patogene bakterije *Escherichia coli*. In: Gubina M, Ihan A, eds. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002: 185–7.

Apaire-Marchais V, Robertson BH, Aubineau-Ferre V, et al. Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 3977–80.

Arauz-Ruiz P, Sundqvist L, Garcia Z, et al. Presumed common source outbreaks of hepatitis A in an endemic area confirmed by limited sequencing within the VP1 region. J Med Virol 2001; 3: 449–56.

Arbuthnott JP. Staphylococcal a-toxin. In: Montie TC, Kadis S, Ajl SJ, eds. Microbial toxins. Vol. 3. New York: Academic Press, 1970: 189–236.

Askar M, Faber MS, Frank C, et al. Update on the ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O104, Germany, May 2011. Euro Surveill 2011; 16(22): pii=19883. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19883 (5. jul 2011).

Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, et al. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 3014–8.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 15–37.

Baumann P, Shubert RHW. Family II. *Vibrionaceae*. In: Krieg NR, Holt JG, eds.Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins, 1984: 516–50.

Bauer A, Ostensvik O, Florvag M, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus, V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*). Appl Environ Microbiol 2006; 72: 3058–61.

Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Meth 1999; 36: 215–25.

Bennani M, Badri S, Baibai T, et al. First detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and coastal environments of Morocco.
Appl Biochem Biotechnol 2011; 165: 290–9.

Bentivoglio M, Pacini P. Filippo Pacini: a determined observer.
Brain Res Bull 1995; 2: 161–5.

Bergey DH, Holt JH. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994: 179–80.

Bertram JG. The harvest of the sea including sketches of fisheries & fisher folk: 3rd ed. London: John Murray, Albemarle street, 1873: Chapter XIII. Our shell-fish fisheries.
http://www.electricscotland.com/lifestyle/sea/chapter13.htm (5 sep 2011).

Bettelheim KA. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: a red herring? J Med Microbiol 2001; 50: 201–2.

Beuret C. A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. J Virol Methods 2003; 107: 1–8.

Beutin L, Geier D, Steinrück H, et al. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J Clin Microbiol 1993; 9: 2483–8.

Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J Clin Microbiol 1999; 37: 497–503.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28: 495–503.

Bosch A. The survival of enteric viruses in the water environment. Microbiologia 1995; 11: 393–6.

Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Internatl Microbiol 1998; 1: 191–6.

Bostock AD, Mempham P, Philips S, et al. Hepatitis A infection associated with the consumption of mussels. J Infect 1979; 1: 171–7.

Bouvet J, Bavai C, Rossel R, et al. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157: H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. Int J Food Microbiol 2001; 71: 249–55.

Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, et al. Detection of noroviruses in shellfish in The Netherlands. Int J Food Microbiol 2006; 108: 391–6.

Breznik B. Enterohemoragični tipi bakterije *Escherchia coli* pri govedu in toplotno neobdelanih mesninah v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1997. Magistrska naloga.

Bugarel M, Beutin L, Scheutz F, et al. Identification of genetic markers for differentiation of Shiga toxin-producing, enteropathogenic, and avirulent strains of *Escherichia coli* O26. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 2275–81.

Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. J Gen Virol 2007; 88: 3347–59.

Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, et al. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. PLoS Pathog 2010; 6: e1000831. http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000831 (17 avg 2011).

Caburlotto G, Ghidini V, Gennari M, et al. Isolation of a *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain from a marine water sample obtained in the northern Adriatic. Euro Surveill 2008; 13(11): pii=8068. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8068 (12 sep 2010).

Caul EO. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part 1. The clinical and diagnostic perspective. J Clin Pathol 1996; 49: 874–80.

Cavallo RA, Stabili L. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). Water Res 2002; 36: 3719–26.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne diseases active surveillance network, 1996. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997; 46: 258–61.

Chapman PA, DJ Wright, Siddons CA. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. J Med Microbiol 1994; 40: 424–7.

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. Int J Food Microbiol 2001; 68: 11–20.

Chaterjee BD, Mukherjee A, Sanyal SN. Enteroinvasive model of *Vibrio parahaemolyticus*. Indian J Med Res 1984; 79: 151–8.

Chatterjee BD, De PK, Hati AK, et al. Fly borne *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta. Trop Geograph Med 1978; 30: 499–503.

Chironna M, Germinario C, De Medici D, et al. Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy).
Int J Food Microbiol 2002; 75: 11–8.

Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. Emerg Infect Dis 2000; 6: 631–6.

Cliver DO. Vehicular transmission of hepatitis A. Public Health Rev 1985; 13: 235–92.

Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, et al. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: Comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. J Virol 1987; 61: 50–9.

Collin B, Rehnstam-Holm AS. Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden. FEMS Microbiol Ecol 2011; 78: 306–13.

Conedera G, Dalvit P, Martini M, et al. Verocytoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and diary products in Italy. Int J Food Microbiol 2004; 96: 67–73.

Colomba C, Saporito L, Giammanco GM, et al. Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. Emerg Infect Dis 2007; 13: 1389–91.

Comelli HL, Rimstad E, Larsen S, et al. Detection of norovirus genotype I.3b and II.4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods. Int J Microbiol 2008; 127: 53–9.

Conaty S, Bird P, Bell G, et al. Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: the first reported outbreak. Epidemiol Infect 2000; 124: 121–30.

Costa–Mattioli M, Di Napoli A, Ferre V, et al. Genetic variability of hepatitis A virus. J Gen Virol 2003; 84: 3191–201.

Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription–PCR assay for quantifi cation of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 3846–55.

Croci L, Ciccozzi M, De Medici D, et al. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. J Appl Microbiol 1999; 87: 884–8.

Cromeans T, Sobsey MD, Fields HA. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. J Med Virol 1987; 22: 45–56.

Crowley LV. An introduction to human disease. 8th ed. Canada: Jones and Bartlett Publishers, Chapter 23. The gastrointestinal tract. 2010: 598.

Daniels NA, Ray B, Easton A, et al. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: a prevention quandary. JAMA 2000a; 284: 1541–5.

Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. J Infect Dis 2000b; 181: 1661–6.

de Paula VS, Villar LM, Gaspar AMC. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. Braz J Infect Dis 2003; 7: 135–41.

de Roda Hausman AM, Lodder-Verschoor F, van den Berg HH, et al. Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks. J Food Prot 2007; 70: 967–74.

DePaola A, Hopkins LH, Peeler JT et al. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 2299–302.

DePaola A, Kaysner CA, Bowers J, et al. Environmental Investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in Oysters after Outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). Appl Environ Microbiol 2000; 66: 4649–54.

DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, et al. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1521–6.

Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, et al. Application of polymerase chain reaction for detection of Vibrio parahaemolyticus associated with tropical seafoods and coastal environment. Lett Appl Microbiol 2003; 36: 423–7.

Di Pinto A, Ciccarese G, De Corato R, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. Food Control 2008; 19: 1037–41.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, et al. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. Nat Rev Microbiol 2010; 8: 231–41.

Dore B, Keaveney S, Flannery J, et al. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. Euro Surveill. 2010; 15(19): pii/19567. http://www.eurosurveillance.eu/ViewArticle.aspx?ArticleId=19567 (12 avg 2011).

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, et al. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. J Gen Virol 2004; 85: 79–87.

Dundas S, Todd A. *Escherichia coli* O157 and human disease. Curr Opin Infect Dis 1998; 11: 171–5.

Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobacteriaceae. Minneapolis: Burgess Publishing 1972: 67–107.

Erickson MC, Doyle MP. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Food Prot 2007; 70: 2426–49.

Escherich T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglinge. Fortschr Med 1885; 3:515–22,547–54, cit po: Hacker J, Blum-Oehler G. In appreciation of Theodor Escherich. Nat Rev Microbiol 2007; 5: 902.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008. Stockholm: ECDC, 2008: 146–9. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812_SUR_Annual_Epidemiological_Report_2008.pdf (10 avg 2011).

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC, 2010: 72–80. http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1011_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf (10 avg 2011).

EFSA, European Food Safety Authority. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA J 2010; 8(1): 1496: 209–20. http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1496.htm (10 sep 2011).

EFSA, European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009.
EFSA J 2011a; 9(3): 2090: 200–84.
http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090.htm (10 sep 2011).

EFSA, European Food Safety Authority. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: taking stock. EFSA J 2011b; 9(10): 2390.
http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2390.pdf (2 dec 2011).

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States.
J Infect Dis 2002; 186: 1–7.

FDA, Food and Drug Administration. Center for food safety and spplied nutrition. The bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook 1992.
http://www.seafoodhaccp.com/SeafoodData/BadBugBook/CHAP31.HTML (7 Dec 2011) .

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science 1973; 182: 1026–8.
Fiore AE. Hepatitis A transmitted by food. Clin Infect Dis 2004; 38: 705–15.

Franco E, Toti L, Gabrieli R, et al. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* experimentally contaminated with hepatitis A virus. Int J Food Microbiol 1990; 11: 321–7.

Fuenzalida L, Hernández C, Toro J, et al. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. Environ Microbiol 2006; 8: 675–83.

Fujino T. Bacterial food poisoning. Saishin Igaku 1951; 6: 263–71, cit po: T. Fujino R, Sakazaki R, Tamura K. Designation of the type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species. Int J Syst Bacteriol 1974; 4: 447–9.

Gallay A, De Valk H, Cournot M, et al. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 561–70.

Garcia A, Fox JG, Besser TE. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a one health perspective. ILAR J 2010; 51: 221–32.

Goller JL, Dimitriadis A, Tan A, et al. Long-therm features of norovirus gastroenteritis in the elderly. J Hosp Infect 2004; 58: 286–91.

Gombač M, Fonda I, Sitar R, et al. Najpogostejše bolezni in patogeni organizmi gojenih slovenskih mediteranskih klapavic (*Mytilus galloprovincialis*).
Slov Vet Res 2011; 48 (Suppl13): 98–100.

Gomez-Gil B, Roque A. Isolation, enumeration and preservation of the *Vibrionaceae*. In: Thompson FL, Austin B, Swings J, eds. The biology of vibrios. Washington: ASM Press, 2006: 15–26.

Gonzalez-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, et al. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. Emerg Infect Dis 2005; 11: 129–131.

Gonzalez-Escalona N, Blackstone GM, DePaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 7925–79.

Gosling EM. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Oxford: Blackwell Publishing, 2003: 284–32.

Gourmelon M, Montet MP. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. Appl Microbiol 2006; 100: 85–97.

Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the caliciviruses. J Infect Dis 2000; 181(Suppl2): S322–30.

Greening GE, Hewitt J, Hay BE, et al. Persistence of Norwalk-like viruses over time in Pacific oysters grown in the natural environment. In: 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety Santiago de Compostela, 2002: 367–77.

Greening GE, Hewitt J. Norovirus detection in shellfish using a rapid, sensitive virus recovery and real-time RT-PCR detection protocol. Food Anal Methods 2008; 1: 109–18.

Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, eds. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, 1995: 739–61.

Grmek Košnik I, Peternelj B, Pohar M, et al. Outbreak of norovirus infection in a nursing home in northern Slovenia. Euro Surveill 2007; 12(41): pii=3286. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3286 (22 avg 2011).

Guillois-Bécel Y, Couturier E, Le Saux JC, et al. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. Euro Surveill 2009; 14(10): pii=19144. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19144 (27.avg 2011).

Guyon R, Dorey F, Collobert JF, et al. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in shellfish (*Crassostrea gigas*). Sci Aliments 2000; 20: 457–65.

Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli:* an overview. J Anim Sci 2006; 85: 45-62.

Hadler SC, Webster HM, Erben JJ, et al. Hepatitis A in day-care centers.
N Engl J Med 1980; 302: 1222–7.

Hadler SC. Global impact of hepatitis A infection: changing patterns. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. Viral hepatitis and liver disease. Baltimer: Williams and Wilkins, 1991: 14–20.

Harth E, Matsuda L, Hernández C, et al. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. Emerg Infect Dis 2009; 15: 163–8.

Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, et al. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. J Infect Dis 1991; 164: 852–9.

Herrington DA, Hall RH, Losonsky GA, et al. Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for Vibrio cholerae pathogenesis in humans.
J Exp Med 1988; 168: 1487–92.

Harrington PR, Vinjé J, Moe CL, et al. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. J Virol 2004; 78: 3035–45.

Hauffman DE, Nelson KL, Rose JB. Calicivirus – an emerging contaminant in water: state of the art. Environ Eng Sci 2003; 5: 503–15.

Hepburn NF, MacRae M, Johnston M, et al. Optimising enrichment conditions for the isolation of *Escherichia coli* O157 in soils by immunomagnetic separation. Lett Appl Microbiol 2002; 34: 365– 9.

Hlady WG, Klontz KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981–1993. J Infect Dis 1996; 176: 1176–83.

Honda T, Lida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins. Rev Med Microbiol 1993; 4: 106–13.

Honda T, Ni YX, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. Infect Immun 1988; 56: 961–5.

Huang P, Farkas T, Marionneau S, et al. Noroviruses bind to human AB0, Lewis, and secretor histoblood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. J Infect Dis 2003; 188: 19–31.

Huang PW, Farkas T, Zhong WM, et al. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificity and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. J Virol 2005; 79: 6714–22.

Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 379–433.

Hussein HS, Bollinger LM. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. J Food Prot 2005; 68: 2224–41.

Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, et al. Norwalk virus infection and disease in associated with AB0 histo-blood group type. J Infect Dis 2002; 185: 1335–7.

IDSC, Infectious disease surveillance center Tokyo. *Vibrio parahaemolyticus*, Japan 1996-1998. http://idsc.nih.go.jp/iasr/20/233/tpc233.html (11 nov 2011).

Iida T, Suthienkul O, Park KS, et al. Evidence for genetic linkage of the *ure* & *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. J Med Microbiol 1997; 46: 639–45.

Ike AC, Brockmann SO, Hartelt K, et al. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. J Clin Microbiol 2006; 44: 1262–7.

Inouye S, Yamashita K, Yamadera S et al. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. J Infect Dis 2000; 181 (Suppl. 2): S270–4.

ISO 8914:1990. Microbiology – General guidance for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Geneve: International Organization for Standardization, 1990: 1–20.

ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. Geneve: International Organization for Standardization; 2001: 1–12.

ISO/TS 16649-3:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide. Geneve: International Organization for Standardization, 2005: 1–8.

ISO/TS 21872-1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. – Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. Geneve: International Organization for Standardization, 2007: 1–20.

IVZ. Črevesne nalezljive bolezni in zoonoze. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2006. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja RS, 2009: 39–41 http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=105&pi=5&_5_id=788&_5_PageIndex=0&_5_groupId=155&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=105-5.0. (21 mar 2011).

Jansen RW, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method.
Proc Nat Acad Sci USA 1990; 87: 2867–71.

Jaykus LA, DeLeon R, Sobsey MD. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization.
Appl Environ Microbiol 1996; 62: 2074–80.

Jenkins C, Pearce MC, Smith AW, et al. Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. Lett Appl Microbiol 2003; 37: 207–12.

Jiang XP, Chai TJ. Survival of *V. parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells.
Appl Environ Microbiol 1996; 62: 1300–5.

Johnson CN, Flowers AR, Young VC, et al. Genetic relatedness among tdh+ and trh+ *Vibrio parahaemolyticus* cultured from Gulf of Mexico oysters (*Crassostrea virginica*) and surrounding water and sediment. Microb Ecol 2009; 57: 437–43.

Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, et al. Multiplechallenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. J Infect Dis 1990; 161: 18–21.

Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, et al. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples.
Appl Environ Microbiol 2005; 71: 1870–5.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on realtime quantitative reverse transcription-PCR.
J Clin Microbiol 2003; 41: 1548–57.

Kaneko T, Colwell RR. Incidence of *V. parahaemolyticus* in Chesapeake Bay.
Appl Microbiol 1975; 30: 251–7.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*.
Nat Rev Microbiol 2004; 2: 123–40.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Doline R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle assoxiated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol 1972; 10: 1075–81.

Karch H, Meyer T, Rüssmann H, et al. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. Infect Immun 1992; 60: 3464–7.

Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. J Clin Microbiol 2001; 39: 2043–9.

Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima HS, et al. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk- like viruses. Virology 2002; 299: 225–39.

Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. J Clin Microbiol 1999; 37: 1173–7.

Kingsley DH, Richards GP. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalklike viruses in shellfish. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 4152–7.

Kirkwood CD, Clark R, Bogdanovic-Sakran N, et al. A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998–2002). J Med Virol 2005; 77: 96–101.

Kishishita M, Matsuoka N, Kumagai K, et al. Sequence variation in the thermostable direct hemolysin related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 2449–57.

Kita-Tsukamoto K, Oyaizu H, Nanba K, et al. Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol 1993; 43: 8–19.

Khanna B, Spelbring JE, Innis BL, et al. Characterization of a genetic variant of human hepatitis A virus. J Med Virol 1992; 36: 118–24.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J Virol Methods 2002; 100: 107–14.

Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, et al. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. J Infect Dis 2000; 181 (Suppl 2): S262–9.

Koopmans M, Bonsdorff CH, Vinjé J, et al. Foodborne viruses. FEMS Microbiol Rev 2002; 26: 187–205.

Koopmans M, Vennema H, Heersma H, et al. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1136–42.

Kroneman A, Vennema H, Harris J, et al. Food-borne viruses in Europe network. Increase in norovirus activity reported in Europe. Euro Surveill 2006; 11(50): pii=3093. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3093 (10. sep 2010)

Kroneman A, Verhoef L, Harris J, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe network from 1-7-2001 to 30-6-2006. J Clin Microbiol 2008; 46: 2959–65.

Kuhnert P, Dubosson CR, Roesch M, et al. Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. Vet Microbiol 2005; 109: 37–45.

Kumar HS, Otta S, Karunasagar I. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR.
Lett Appl Microbiol 2001; 33: 334–8.

Kumar HS, Karunasagar I, Teizou T, et al. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef.
FEMS Microbiol Lett 2004; 233: 173–78.

Kumar V, Das S, Jameel S. The biology and pathogenesis of hepatitis viruses. Curr Sci 2010; 98: 312–25.

Lau CS, Wong DA, Tong LK, et al. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. J Med Virol 2004; 73: 113–7.

Le Guyader FS, Estes MK, Hardy ME, et al. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. Arch Virol 1996a; 141: 2225–35.

Le Guyader FS, Neill FH, Estes MK, et al. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. Appl Environ Microbiol 1996b; 62: 4268–72.

Le Guyader FS, Haugarreau L, Miossec L, et al. Three year study to assess human enteric viruses in shellfish. Appl Environ Microbiol 2000; 8: 3241–8.

Le Guyader F, Loisy F, Atmar RL, et al. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. Emerg Infect Dis 2006a; 12: 931–6.

Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, et al. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. J Clin Microbiol 2006b; 44: 3878–82.

Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, et al. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. Am J Epidemiol 1985; 122: 226–33.

Lee CY, Pan SF, Chen CH. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR.
Appl Environ Microbiol 1995; 61: 1311–7.

Lee CY, Cheng MF, Yu MS, et al. Purification & characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *V. parahaemolyticus*. FEMS Microbiol Lett 2002; 209: 31–7.

Lee N, Chan MC, Wong B, et al. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. Emerg Infect Dis 2007; 13: 1399–401.

Lees DN, Henshilwood K, Green J, et al. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 4418–24.

Lees DN. Viruses and bivalve shellfish. Int J Food Microbiol 2000; 59: 81–116.

Legeay O, Caudrelier Y, Cordevant C, et al. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. J Virol Methods 2000; 90: 1–14.

Lemon SM. Hepatitis A virus: current concepts of the molecular virology, immunobiology and approaches to vaccine development. Rev Med Virol 1992; 2: 73–87.

Lemon SM. Hepatitis A virus. In: Webster RG, Granoff A, eds. Encyclopedia of virology. London: Academic Press, 1994: 546-54.

Lin Z, Kumagai K, Baba K, et al. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. J Bacteriol 1993; 175: 3844–55.

Lindell AT, Grillner L, Svensson L, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000–2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. J Clin Microbiol 2005; 43: 1086–92.

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. Nat Med 2003; 9: 548–53.

Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. PLoS Med 2008; 5(2): e31. http://www.plosmedicine.org/article/info:doi/10.1371/journal.pmed.0050031 (10 jun 2011).

Loisy F, Atmar RL, Le Saux JC, et al. Use of Rotavirus virus like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. Appl Environ Microbiol 2005a; 71: 6049–53.

Loisy F, Atmar RL, Guillon P, et al. Real time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. J Virol Methods 2005b; 123:1–7.

Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. J Clin Virol 2002; 24: 137–60.

Lopman BA, Reacher MH, Duijnhoven YV, et al. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. Emerg Infect Dis 2003; 9: 90–96.

Low JC, McKendrick LJ, McKechnie C, et al. Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 in slaughtered cattle. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 93–7.

Lu L, Ching KZ, Salete de Paula V, et al. Characterization of the complete genome sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). J Gen Virol 2004; 85: 2943–52.

Luan XY, Chen JX, Zhang XH, et al. Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 2007; 44: 242–7.

Maalouf H, Pommepuy M, Le Guyader FS. Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. Food Environ Virol 2010; 2: 136-45.

Macaluso A, Petrinca A, Lanni L, et al. Identification and sequence analysis of hepatitis A virus detected in market and environmental bivalve molluscs. J Food Prot 2006; 69: 449–52.

Mackiewicz V, Roque-Afonso A, Marchadier M, et al. Rapid investigation of hepatitis A virus outbreak by single strand conformation polymorphism analysis.
J Med Virol 2005; 76: 271–8.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River: Pearson Education. 2003: 351–78.

Makino K, Oshima O, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. Lancet 2003; 361: 743–9.

Malfait P, Lopalco PL, Salmaso S, et al. An outbreak of hepatitis A in Puglia, Italy, 1996. Eurosurveillance 1996; 1(5): 33–5. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=144 (21 nov 2011).

March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol 1986; 23: 869–72.

Martinez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1319–20.

Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, Varela-Pet J, et al. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 265–74.

Masini L, De Grandis G, Principi F, et al. Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). Water Res 2007; 41: 4031–40.

Mathusa EC, Chen Y, Enache E, et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. J Food Prot 2010; 73: 1721–36.

McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, et al. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. J Clin Microbiol 1982; 16: 957–8.

McLaughlin JB, DePaola A, Bopp CA, et al. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. N Engl J Med 2005; 353: 1463–70.

Melton-Chelsa AR, O'Brien A. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: Kaper JB, O'Brien AD, eds. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington: American Society for Microbiology, 1998: 121–8.

Mesquita JR, Vaz L, Cerqueira S, et al. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. Food Microbiol 2011; 28: 936–41.

Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology — a trip of over 50 years. Annu Rev Microbiol 1995; 49: 461–87.

Mihorič A. Molekularno določanje človeških kalicivirusov v školjkah. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 2007. Diplomsko delo.

Miossec L, Le Guyader F, Haugarreau L, et al. Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population. Rev Epidemiol Sante Publique 2000; 48(Suppl 2): 2S62–71.

Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, et al. In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: Its close correlation with human pathogenicity. J Bacteriol 1969; 100: 1147–9.

Morris J, Black R. Cholera & other vibrioses in the United States.
N Engl J Med 1985; 312: 343–50.

Mullendore JL, Sobsey MD, Shieh YC. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. J Virol Methods 2001; 94: 25–35.

Muniain-Mujika I, Girones R, Lucena F. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses.
J Virol Methods 2000; 89: 109–18.

Muniain-Mujika, Calvo M, Lucena F, et al. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. Int J Food Microbiol 2003; 83: 75–85.

Myrmel M, Berg EM, Rimstad E, et al. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 2678–84.

Nainan OV, Armstrong GL, Han X-H, et al. Hepatitis A molecular epidemiology in the United States, 1996-1997: Sources of infection and implications of vaccination policy. J Infect Dis 2005; 191: 957–63.

Nainan OV, Xia G, Vaughan G, et al. Diagnosis of Hepatitis A virus infection: a molecular approach. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 63–79.

Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 142–201.

Nenonen NP, Hannoun C, Horal P, et al. Tracing of norovirus outbreak strains in mussels collected near sewage effluents. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 2544-9.

Nielsen EM, Andersen MT. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 59 nuclease PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41: 2884–93.
Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infect Immun 1995; 63: 2093–9.

Nishibuchi M, Kaper JB. Duplication & variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus.* Mol Microbiol 1990; 4: 87–99.

Nishibuchi M, Fasano A, Russell RG, et al. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin.
Infect Immun 1992; 60: 3539–45.

Normanno G, Parisi A, Addante N, et al. *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). Int J Food Microbiol 2006; 106: 219–22.

Ogden ID, Hepburn NF, MacRae M. The optimisation of isolation media used in immunomagnetic methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods.
J Appl Microbiol 2001; 91: 373–9.

Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, et al. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. J Clin Microbiol 1997; 35: 3150–5.

Okura M, Osawa R, Iguchi A, et al. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR Assay.
J Clin Microbiol 2003; 41: 4676–82.

Oliver JD. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. In: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P, eds. Microbial biosystems: new frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Halifax, Canada, 1999: 723-30.

Oliver JD, Kaper JB. *Vibrio species*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press, 1997: 228–64.

Ono T, Park K-S, Ueta M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. Infect Immun 2006; 74: 1032–42.

Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Blanco M, et al. Prevalence and characterization of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. Epidemiol Infect 2003; 130: 313–21.

Orožen Adamič M. Geomorfološke značilnosti Tržaškega zaliva in obrobja. Ljubljana: Znanstvenoraziskovalni center SAZU, 2002: 143–55. Dela 18.

Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, et al. First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy. J Clin Microbiol 2008; 46: 2144–5.

Ottaviani D, Leonia F, Rocchegiania E, et al. Prevalence, serotyping and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels from Italian growing areas, Adriatic Sea. Environ Microbiol Rep 2010a; 2: 192–7.

Ottaviani D, Leonia F, Rocchegiania E, et al. *Vibrio parahaemolyticus* – associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. Diagn Microbiol Infect Dis 2010b; 66: 452–5.

Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, et al. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. N Engl J Med 1977; 297: 86–9.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1224–31.

Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays *stx1*, *stx2, eaeA,* enterohemorrhagic *E. coli hlyA, rfb* O157. J Clin Microbiol 1998; 36: 598–602.

Pearce MC, Jenkins C, Vali L, et al. Temporal shedding patterns and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 1708–16.

Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, et al. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. J Med Virol 2007; 79: 1388–400.

Piérard D, Muyldermans G, Moriau L, et al. Identification of new Verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 3317–22.

Pitikala N, Bauer N, Eblen D, et al. Draft risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC). Washington: Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, 2011: 10–14. www.fsis.usda.gov/pdf/non_o157_stec_risk_profile.pdf. (5 dec 2011).

Pollard D, Johnson W, Lior H, et al. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain-reaction. J Clin Microbiol 1990; 28: 540–5.

Poljšak-Prijatelj M, Zimšek J, Bufon T, et al. Molecular detection and epidemiology of Norwalk-like viruses in Slovenia in 2000-2001. J Clin Virol 2001a; 22: 196.

Poljšak-Prijatelj M, Zimšek J, Bufon T, et al. Molecular detection of human caliciviruses in Slovenia. In: 6th international symposium on positive strand RNA viruses: scientific program and adstracts. Paris, 2001b: P2-101.

Poljšak-Prijatelj M, Frelih T, Zimšek J, et al. Kalicivirusi – povzročitelji epidemičnega gastroenteritisa pri otrocih v vrtcu – izkušnje v Sloveniji. Zdrav Vestn 2001c; 70: 619–22.

Poljšak-Prijatelj M, Zimšek J, Hočevar Grom A, et al. Norovirus associated outbreaks of gastroenteritis in homes for the elderly in Slovenia in the winter season 2002-2003. In: 2nd European Congress of Virology Eurovirology 2004. Madrid: Medicine Faculty of the Complutense University, 2004: 103.

Pommepuy M, Pothier P, Ruggeri FM. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. J Clin Microbiol 2006; 44: 3878–82.

Pontrelli G, Boccia D, DI Renzi M, et al. Epidemiological and virological characterization of a large communitywide outbreak of hepatitis A in southern Italy. Epidemiol Infect 2008; 136: 1027–34.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science 1999; 286: 287–90.

Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o cepljenju, zaščiti z zdravili in varstvu pred vnosom in razširjenjem nalezljivih bolezni. Ur List RS 2006; 16(92). http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200692&stevilka=3974 (28. nov 2011).

Quilici ML, Robert-Pillot A, Picart J, et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1148–9.

Ramirez S, Giammanco GM, De Grazia S, et al. Genotyping of GII.4 and GIIb norovirus RT-PCR amplicons by RFLP analysis. J Virol Methods 2008; 147: 250–6.

Ramirez S, Giammanco GM, De Grazia S, et al. Emerging GII.4 norovirus variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. J Med Virol 2009; 81: 139–45.

Rees G, Pond K, Kay D, Santo Domingo J, eds. Safe management of shellfish and harvest waters. London: IWA Publishing; WHO, 2010: 2–10.

Reichelt JL, Baumann P. Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria. Arch Microbiol 1974; 97: 329–45.

Reintjes R, Bosman A, de Zwart O, et al. Outbreak of hepatitis A in Rotterdam associated with visits to 'darkrooms' in gay bars. Commun Dis Public Health 1999; 2: 43–6.

Reuter G, Krisztalovics K, Vennema H, et al. Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks-emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. J Med Virol 2005; 76: 598–607.

Reuter G, Vennema H, Koopmans M, et al. Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary. J Clin Virol 2006; 35: 84–8.

Rejec Brancelj I. Morje. In: Uhan J, Bat M, eds. Vodno bogastvo Slovenije. Ljubljana: Ministrstvo za okolje prostor in energijo, Agencija RS za okolje, 2003: 69–73.

Richards GP. Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United States: requisite for development of viral guidelines. J Food Prot 1985; 48: 815–23.

Richards GP, Watson MA, Fankhauser RL, et al. Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. Appl EnvironMicrobiol 2004; 70: 7179–84.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 1983; 308: 681–5.

Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM, et al. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy.
Int J Food Microbiol 1999; 49: 43–8.

Rippey SR. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption.
Clin Microbiol Rev 1994; 7: 419–25.

Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. J Gen Virol 1992; 73: 1365–77.

Rohayem J, Munch J, Rethwilm A. Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. J Virol 2005; 79: 4977–90.

Romalde JL, Area E, Sánchez G, et al. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve mollusks from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. Int J Food Microbiol 2002; 74: 119–30.

Roos R. Hepatitis epidemic conveyed by oysters. Sven Lakartidningen 1956; 53: 989–1003.

Rosec JP, Simon M, Causse V, et al. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: comparison of PCR protocols using pR72H or *toxR* targets with a culture method. Int J Food Microbiol 2009; 129: 136–45.

Sakazaki R. Bacteriology of *Vibrio* & related organisms. In: Barua D, Greenough WB, eds. Cholera. New York: Plenum Medical Book Company, 1992: 37–55.

Sakurai J, Matsuzaki A, Miwatani T. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 1973; 8: 775–80.

Sala MR, Arias C, Domínguez A et al. Foodborne outbreak of gastroenteritis due to Norovirus and *Vibrio parahaemolyticus*. Epidemiol Infect 2009; 137: 626–9.

Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington: ASM Press, 1994: 30–46.

Samadpour M, Ongerth JE, Liston J, et al. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 1038–40.

Sanchez G, Pinto RM, Vanaclocha H, et al. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak.
J Clin Microbiol 2002; 40: 4148–55.

Sanyal SC, Sen PC. Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. In: Fujimo T, SakaguchiG, Sakazaki R, Takeda Y, eds. International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. Tokyo, 1974: 227–30.

Sarkar BL, Nair GB, Banerjee AK, et al. Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater environs and in association with freshwater fishes in Calcutta.
Appl Environ Microbiol 1985; 49: 132–6.

Schmidt H, Scheef J, Huppertz HI, et al. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H- strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and haemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 1999; 37: 3491–6.

Schnagl RD, Barton N, Patrikis M, et al. Prevalence and genomic variation of Norwalk-like viruses in central Australia in 1995–1997. Acta Virol 2000; 44: 265–71.

Schwab KJ, Neill FH, Estes MK, et al. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT PCR. J Food Prot 1998; 61: 1674–80.

Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, et al. Animal noroviruses. Vet J 2008; 178: 32–45.

Scotter S, Aldridge M, Capps K. Validation of a method for the detection of *E. coli* O157:H7 in foods. Food Control 2000; 11: 85– 95.

Shieh YC, Calci KR, Baric RS. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4709–14.

Shieh YC, Khudyakov YE, Xia G, et al. Molecular confirmation of oysters as the vector for hepatitis A in a 2005 multistate outbreak. J Food Prot 2007; 70: 145–50.

Shirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. Infect Immun 1990; 58: 3568–73.

Siegl G, Weitz M, Kronauer G. Stability of hepatitis A virus. Intervirology 1984; 22: 218-26.

Sobsey MD, Shields PA, Hauchman FH, et al. Survival and transport of hepatitis A virus in soils, groundwater and wastewater. Water Sci Technol 1989; 18: 97–106.

Sockett PN, Cowden JM, Le Baigue S, et al. Foodborne disease surveillance in England and Wales: 1989-1991. Commun Dis Rep CDR Rev 1993; 3: R159–73.

Strachan NJC, Fenlon DR, Ogden ID. Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157.
FEMS Microbiol Lett 2001; 203: 69–73.

Steyer A, Godič Torkar K, Gutierrez Aguirre I, et al. High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. Int J Hyg Environ Health 2011; 214: 392–8.

Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. Emerg Infect Dis 2007; 13: 396–403.

Sudheesh PS, Xu HS. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: Possible role of extracellular proteases. Aquaculture 2001; 196: 37–46.

Suffredini E, Corrain C, Arcangeli G, et al. Occurrence of enteric viruses in shellfish and relation to climatic-environmental factors. Lett Appl Microbiol 2008; 47: 467–74.

Suffredini E, Pepe T, Ventrone I, et al. Norovirus detection in shellfish using two real-time RT-PCR methods. New Microbiol 2011; 34(1): 9–16.

Svraka S, Duizer E, Vennema H, et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005.
J Clin Microbiol 2007; 45: 1389–94.

Štrumbelj I, Poljšak-Prijatelj M, Petraš T, et al. S kalicivirusi povzročena epidemija gastroenteritisa v domu za starejše osebe. Zdrav Vestn 2003; 72: 279–82.

Tacket CO, Barrett TJ, Sanders GE, et al. Panophthalmitis caused by *Vibrio parahaemolyticus*. J Clin Microbiol 1982; 16: 195–6.

Takahashi A, Sato Y, Shiomi Y, et al. Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue & a human intestinal epithelial cell line. J Med Microbiol 2000; 49: 801–10.

Takeda Y, Hori Y, Miwatani T. Demonstration of a temperature-dependent inactivating factor of the thermostable direct hemolysin in *Vibrio parahaemolyticus*.
Infect Immun 1974; 10: 6-10.

Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24: 1596–9.

Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. J Virol 2004; 78: 6233–42.

Tan M, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. J Virol 2005; 79: 14017–30.

Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. Microb Pathog 1986; 1: 425–32.

Taniguchi H, Ohta H, Ogawa M, et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes.
J Bacteriol 1985; 162: 510–5.

Taylor CM. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. Pediatr Nephrol 2008; 23: 1425–31.

Teunis PFM, Moe CL, Lui P, et al. Norwalk virus: how infectious is it? J Med Virol 2008; 80: 1468–76.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 1994; 22: 4673–80.

Tian P, Bates A, Jensen H, et al. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. Lett Appl Microbiol 2006; 43: 645–51.

Topic Popovic N, Benussi Skukan A, Dzidara P, et al. Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. Vet Med 2010; 5: 233–41.

Totsuka A, Moritsugu Y. Hepatitis A virus proteins. Intervirology 1999; 42: 63–8.

Traore O, Arnal C, Mignotte B, et al. Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus, and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 3118–22.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. J Clin Microbiol 2006; 44: 1405–12.

Tu ET, Bull RA, Kim MJ, et al. Norovirus excretion in an aged-care setting. J Clin Microbiol 2008; 46: 2119–21.

Turk T. Pod gladino mediterana. Ljubljana: Modrijan, 2007: 14–35.

Uhrbrand K, Myrmel M, Maunula L, et al. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels.
J Virol Methods 2010; 169: 70–8.

Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. UL L 2005; 338: 1–26.

Uredba evropskega parlamenta in sveta (ES) št. 854/2004 o določitvi posebnih predpisov za organizacijo uradnega nadzora proizvodov živalskega izvora, namenjenih za prehrano ljudi. UL L 2004; 139: 1–141.

Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 681–7.

Vennema H, de Briun E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Virol 2002; 25: 233–5.

Vilariño ML, Le Guyader FS, Polo D, et al. Assesment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. Int Microbiol 2009; 12: 145–51.

Vinjé J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. J Infect Dis 1996; 174: 610–5.

Vinjé J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. J Infect Dis 1997; 176: 1374–8.

Vinjé J, Green J, Lewis DC, et al. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses." Arch Virol 2000; 145: 223–41.

Vinjé J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. J Clin Microbiol 2003; 41: 1423–33.

Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. J Virol Methods 2004; 116: 109–17.

VURS, Veterinarska uprava Republike Slovenije. Letno poročilo 2009. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2010: 53–9.

VURS, Veterinarska uprava Republike Slovenije. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2008. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2009: 24–6.

Wagatsuma S. A medium for the test of the hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. Media Circle 1968; 13: 159–62.

Wagley S, Koofhethile K, Wing JB, et al. Comparison of *V. parahaemolyticus* isolated from seafoods and cases of gastrointestinal disease in the UK. Int J Environ Health Res 2008; 18: 283–93.

Wang QH, Han MG, Cheetham S, et al. Porcine noroviruses related to human noroviruses. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1874–81.

Wang QH, Chang KO, Han MG, et al. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. J Virol Methods 2006; 132: 135–45.

Wang QH, Costantini V, Saif LJ. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. Vaccine 2007; 25: 5453–66.

Weitz M, Baroudy BM, Maloy WL, et al. Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs. J Virol 1986; 60: 124–30.

Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000. Emerg Infect Dis 2005; 11: 95–102.

Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 3741–51.

Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. J Infect Dis 1974; 129: 709–14.

Yong HT, Son R. Hepatitis A virus: a general overview. Int Food Res J 2009; 16: 455–67.

Zahorsky J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. Arch Pediatr 1929; 46: 391–5, cit po: Maguire AJ, Green J, Brown DWG, et al. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round-structured viruses in east Anglia, United Kingdom, during the 1996–1997 season. J Clin Microbiol 1999; 37: 81–9.

Zakon o nalezljivih boleznih Ur. List. RS 2006; 33 http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200633&stevilka=1348 (7 avg 2011).

ZZV, Zavod za zdravstveno varstvo Ljubljana, Center epidemiologije. In: Epidemiološko poročilo januar in februar 2009. Ljubljana: ZZV, 1–4. http://www.zzv-lj.si/nalezljive-bolezni/spremljanje-gibanja-nalezljivih-bolezni/epi-por-januar-in-februar-2009.pdf (11 avg 2011).

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 2006; 346: 312–23.

Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, et al. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. J Clin Microbiol 2010; 48: 168–77.

Zimšek J, Poljšak-Prijatelj M, Barlič-Maganja D, et al. Human calicivirus outbreaks in Slovenia in 2000-2002. In: Avšič-Županc T, van Belkum A, Bruschi C, eds. 1st FEMS congress of European microbiologists: abstract book. Ljubljana, 2003. Delft: Federation of European Microbiological Societies, 2003: 167.

Zimšek Mijovski J, Poljšak-Prijatelj M, Steyer A, et al. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. Infect Genet Evol 2010; 10: 413–20.

Zintz C, Bok K, Parada E, et al. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. Infect Genet Evol 2005; 5: 281–90.

Zobell CE. Studies on marine bacteria. 1.The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J Mar Res 1941; 4: 42–75.

11 PRILOGE

Priloga 1: Podobnosti (%) norovirusnih nukleotidnih zaporedij med sevi izoliranimi iz školjk in sevi iz genske baze odseka RdRp norovirusnega genoma

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
1		81.8	96.5	97.5	59.3	97.5	97.5	98.2	81.8	97.2	97.5	97.9	83.2	97.2	98.2	79.6	55.8	60.7	55.1	61.1	89.8	87.4	97.9	98.6	97.5	97.9	97.9	94.0	93.7	80.0	58.2	58.2	82.5	1	Aomori5-2007-JP(AB541227)
2	21.2		82.1	81.8	59.3	81.4	81.8	82.1	94.7	81.4	82.1	82.1	95.4	82.1	81.4	93.7	55.4	60.7	57.5	61.4	84.9	85.3	81.8	81.4	82.1	82.1	82.1	80.4	81.4	94.0	60.7	60.7	96.1	2	Sapporo-2007-JP(GU594164)
3	3.6	20.7		98.2	60.0	97.2	98.2	97.9	82.5	98.6	98.9	98.6	83.5	98.6	96.8	81.1	54.7	60.4	55.8	60.4	89.8	86.7	97.2	96.5	98.2	98.6	98.2	93.7	92.6	81.8	58.9	58.9	82.8	3	Fukui5-2008-JP(AB541250)
4	2.5	21.2	1.8		59.3	98.2	99.3	98.9	81.4	98.9	99.3	99.6	83.2	98.9	97.9	80.0	54.7	59.6	55.1	58.9	90.2	86.3	97.5	97.5	99.3	99.6	99.3	95.1	94.0	80.7	58.2	58.2	82.5	4	Kumamoto2-2007-JP(AB541278)
5	55.7	58.7	54.2	55.7		59.3	59.3	59.6	58.2	59.6	59.6	59.6	58.9	59.6	58.6	58.6	77.5	77.2	95.1	73.7	60.4	45.3	58.6	58.9	59.6	59.6	60.0	58.2	57.9	58.2	96.5	96.5	58.2	5	Leuven-2003-BE(FJ515294)
6	2.5	21.7	2.9	1.8	55.7		98.2	99.3	81.1	97.9	98.2	98.6	82.8	97.9	97.2	81.1	54.7	60.0	55.1	61.1	89.1	86.0	96.8	97.5	98.2	98.6	98.6	93.3	92.3	79.6	58.2	58.2	82.1	6	Miyazaki7-2008-JP(AB541298)
7	2.5	21.2	1.8	0.7	55.7	1.8		98.9	81.4	98.9	99.3	99.6	83.2	98.9	97.9	80.0	54.7	59.6	55.1	60.7	90.2	86.3	97.5	97.5	99.3	99.6	99.3	94.4	93.3	80.7	58.2	58.2	82.5	7	Niigata4-2007-JP(AB541316)
8	1.8	20.7	2.1	1.1	55.0	0.7	1.1		81.8	98.6	98.9	99.3	83.5	98.6	97.9	80.4	55.1	60.4	55.4	61.4	89.8	86.7	97.5	98.2	98.9	99.3	99.3	94.0	93.0	80.4	58.6	58.6	82.8	8	Osaka5-2007-JP(AB541327)
9	21.2	5.5	20.2	21.7	58.0	22.2	21.7	21.2		81.8	81.8	81.8	96.5	81.8	81.1	96.1	56.1	60.4	56.5	61.1	83.9	84.6	81.4	81.1	81.8	81.8	81.8	80.0	81.1	96.8	60.4	60.4	97.5	9	PC03-2006-India(EU019230)
10	2.9	21.7	1.4	1.1	55.0	2.1	1.1	1.4	21.2		98.9	99.3	82.8	98.6	97.5	80.4	54.4	59.6	55.4	60.0	89.8	86.0	97.2	97.2	98.9	99.3	98.9	94.0	93.0	81.1	58.6	58.6	82.1	10	Seul-2008-KOR(FJ595922)
11	2.5	20.7	1.1	0.7	55.0	1.8	0.7	1.1	21.2	1.1		99.6	83.5	99.6	97.9	80.4	54.7	60.4	55.4	60.7	90.5	86.7	97.5	97.5	99.3	99.6	99.3	94.4	93.3	81.1	58.6	58.6	82.8	11	Shenzhen1-2006-CHN(EU794712)
12	2.1	20.7	1.4	0.4	55.0	1.4	0.4	0.7	21.2	0.7	0.4		83.5	99.3	98.2	80.4	54.7	60.0	55.4	60.7	90.5	86.7	97.9	97.9	99.6	100.0	99.6	94.7	93.7	81.1	58.6	58.6	82.8	12	Shimane3-2008-JP(AB541350)
13	19.2	4.8	18.8	19.3	56.5	19.7	19.3	18.8	3.6	19.7	18.8	18.8		83.5	82.8	94.7	56.8	61.4	56.5	61.8	84.6	85.3	83.2	82.8	83.5	83.5	83.5	82.1	82.5	95.1	61.8	61.8	98.6	13	Stockholm-2002-SE(AJ626568)
14	2.9	20.7	1.4	1.1	55.0	2.1	1.1	1.4	21.2	1.4	0.4	0.7	18.8		97.5	80.4	54.4	60.4	55.4	60.7	90.9	86.7	97.2	97.2	99.6	99.3	98.9	94.0	93.0	81.1	58.6	58.6	82.8	14	Toyama3-2007-JP(AB541357)
15	1.8	21.7	3.2	2.1	57.2	2.9	2.1	2.1	22.2	2.5	2.1	1.8	19.7	2.5		79.6	54.4	60.0	54.4	60.7	89.5	86.0	98.2	98.2	97.9	98.2	97.9	93.0	92.6	80.4	57.5	57.5	82.1	15	VIC3863-2007-AU(GQ845322)
16	23.1	6.7	21.1	22.7	57.4	22.2	22.7	22.2	4.0	22.2	22.1	22.2	5.5	22.1	23.1		55.4	60.0	56.1	60.7	82.1	81.8	80.0	79.6	80.4	80.4	80.4	78.6	78.9	95.1	60.0	60.0	96.1	16	VIG-136-PA-BRA-2003(GU012319)
17	58.8	60.2	61.2	62.0	26.8	61.2	61.1	60.3	58.7	62.0	61.2	61.1	60.2	62.0	62.0	60.3		76.1	76.8	72.6	55.4	61.4	54.0	54.4	53.7	54.0	54.0	54.0	56.5	55.4	76.8	76.8	55.8	17	Norwalk-1968-US(M87661)
18	54.2	52.8	54.9	56.4	27.4	55.7	56.4	54.9	53.5	56.4	54.9	55.7	51.4	54.9	55.7	54.2	28.9		75.8	72.3	60.0	61.1	60.0	60.4	60.0	60.0	60.0	60.0	61.1	60.0	77.2	77.2	60.0	18	Chiba-1987-JP(AB042808)
19	61.9	58.0	60.3	61.9	5.2	61.9	61.9	61.0	60.2	61.0	61.1	61.0	60.2	61.1	63.6	59.6	27.8	29.5		72.3	56.8	45.6	54.4	55.4	55.4	55.4	55.4	54.0	56.5	56.8	95.8	95.8	56.8	19	Southampton-1993-UK(L07418)
20	57.2	54.2	58.0	57.2	32.5	56.4	56.4	55.7	58.0	57.9	56.4	56.4	56.4	56.4	58.0	58.7	34.1	34.7	34.7		60.0	57.5	59.6	60.7	60.7	60.7	60.7	56.5	52.6	60.4	74.7	74.7	60.0	20	DesertShield-2000-US(U04469)
21	11.1	17.1	11.1	10.8	55.7	12.0	10.8	11.2	18.5	11.2	10.3	10.3	17.5	9.9	11.6	19.9	62.0	55.7	58.7	56.4		88.1	89.5	89.8	90.9	90.5	90.2	89.5	90.2	83.5	59.3	59.3	83.9	21	Lordsdale-1993-GB(X86557)
22	14.2	16.7	15.1	15.6	60.2	16.0	15.6	15.1	17.6	16.1	15.1	15.1	16.7	15.1	16.0	20.5	55.7	53.5	58.7	57.9	13.3		86.3	86.0	86.7	86.7	86.7	86.3	86.7	83.5	45.6	45.6	85.3	22	Hawaii-1971-US(U07611)
23	2.2	21.2	2.9	2.5	57.2	3.2	2.5	2.5	21.7	2.9	2.5	2.1	19.2	2.9	1.8	22.6	61.2	55.7	63.6	60.4	11.6	15.5		97.9	97.5	97.9	97.5	93.0	92.6	80.7	57.5	57.5	82.5	23	STM2008SI(JN040477)
24	1.4	21.7	3.6	2.5	56.4	2.5	2.5	1.8	22.2	2.9	2.5	2.1	19.7	2.9	1.8	23.1	60.4	54.9	61.1	58.0	11.1	16.0	2.2		97.5	97.9	97.9	93.3	93.0	80.4	57.9	57.9	82.1	24	ST2008SI(JN040478)
25	2.5	20.7	1.8	0.7	55.0	1.8	0.7	1.1	21.2	1.1	0.7	0.4	18.8	0.4	2.1	22.2	62.0	55.7	61.0	56.4	9.9	15.1	2.5	2.5		99.6	99.3	94.4	93.3	81.1	58.6	58.6	82.8	25	DRU2007SI(JN040479)
26	2.1	20.7	1.4	0.4	55.0	1.4	0.4	0.7	21.2	0.7	0.4	0.0	18.8	0.7	1.8	22.2	61.1	55.7	61.0	56.4	10.3	15.1	2.1	2.1	0.4		99.6	94.7	93.7	81.1	58.6	58.6	82.8	26	DRU2008SI(JN040480)
27	2.1	20.7	1.8	0.7	54.2	1.4	0.7	0.7	21.2	1.1	0.7	0.4	18.8	1.1	2.1	22.1	61.1	55.7	61.1	56.4	10.7	15.1	2.5	2.1	0.7	0.4		94.4	93.3	80.7	58.9	58.9	82.8	27	DR2007SI(JN040481)
28	6.3	23.3	6.7	5.1	57.9	7.1	5.9	6.3	23.9	6.3	5.9	5.5	20.8	6.3	7.5	24.8	62.1	55.7	61.0	60.3	11.7	15.7	7.5	7.1	5.9	5.5	5.9		94.7	78.9	57.9	57.9	81.4	28	ST2007SI(JN040482)
29	6.7	21.8	7.9	6.3	58.7	8.3	7.1	7.5	22.3	7.5	7.1	6.7	20.3	7.5	7.9	24.3	58.8	53.5	61.9	60.3	10.8	15.2	7.9	7.5	7.1	6.7	7.1	5.6		80.7	55.4	55.4	82.5	29	SE2008SI(JN040483)
30	23.8	6.3	21.2	22.8	58.0	24.3	22.8	23.3	3.2	22.3	22.2	22.3	5.1	22.2	23.3	5.1	57.9	54.2	60.2	56.4	19.1	19.2	22.8	23.3	22.3	22.3	22.8	25.6	22.9		60.4	60.4	96.5	30	DRT2008SI(JN040484)
31	57.9	57.2	56.4	57.9	3.6	57.9	57.9	57.2	56.5	57.2	57.2	57.2	55.1	57.2	59.5	56.0	27.8	27.4	4.4	30.8	58.7	59.5	59.5	58.7	57.2	57.2	56.4	58.7	61.0	56.5		100.0	59.6	31	DRT2007SI(JN040485)
32	57.9	57.2	56.4	57.9	3.6	57.9	57.9	57.2	56.5	57.2	57.2	57.2	55.1	57.2	59.5	56.0	27.8	27.4	4.4	30.8	58.7	59.5	59.5	58.7	57.2	57.2	56.4	58.7	61.0	56.5	0.0		59.6	32	DR2008SI(JN040486)
33	20.2	4.0	19.7	20.3	58.0	20.7	20.3	19.8	2.5	20.7	19.7	19.8	1.4	19.7	20.7	4.0	59.5	54.2	60.3	57.2	18.5	16.7	20.2	20.7	19.8	19.8	19.7	21.8	20.3	3.6	56.5	56.5		33	Vannes-2000-FR(AY773210)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		

Priloga 2: Podobnosti (%) norovirusnih aminokislinskih zaporedij med sevi izoliranimi iz školjk in sevi iz genske baze odseka RdRp norovirusnega genoma

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		
1		94.7	97.9	96.8	61.1	96.8	97.9	97.9	94.7	97.9	97.9	97.9	94.7	97.9	97.9	93.7	57.9	61.1	61.1	62.1	95.8	94.7	97.9	98.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	93.7	61.1	61.1	94.7	1	Aomori5-2007-JP(AB541227)
2	5.5		96.8	95.8	62.1	94.7	96.8	95.8	98.9	96.8	96.8	96.8	100.0	96.8	94.7	98.9	58.9	62.1	62.1	63.2	96.8	97.9	94.7	95.8	96.8	96.8	96.8	94.7	94.7	98.9	62.1	62.1	100.0	2	Sapporo-2007-JP(GU594164)
3	2.1	3.2		98.9	61.1	97.9	100.0	98.9	95.8	100.0	100.0	100.0	96.8	100.0	97.9	95.8	57.9	61.1	61.1	62.1	95.8	94.7	97.9	98.9	100.0	100.0	100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	3	Fukui5-2008-JP (AB541250)
4	3.2	4.3	1.1		61.1	96.8	98.9	97.9	94.7	98.9	98.9	98.9	95.8	98.9	96.8	94.7	57.9	61.1	61.1	62.1	94.7	93.7	96.8	97.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	94.7	61.1	61.1	95.8	4	Kumamoto2-2007-JP(AB541278)
5	54.4	52.4	54.4	54.4		61.1	61.1	61.1	62.1	61.1	61.1	61.1	62.1	61.1	60.0	62.1	94.7	93.7	100.0	85.3	61.1	62.1	60.0	61.1	61.1	61.1	61.1	61.1	61.1	62.1	100.0	100.0	62.1	5	Leuven-2003-BE(FJ515294)
6	3.2	5.5	2.1	3.2	54.4		97.9	98.9	93.7	97.9	97.9	97.9	94.7	97.9	96.8	93.7	57.9	61.1	61.1	62.1	93.7	92.6	96.8	97.9	97.9	97.9	97.9	95.8	95.8	93.7	61.1	61.1	94.7	6	Miyazaki7-2008-JP(AB541298)
7	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1		98.9	95.8	100.0	100.0	100.0	96.8	100.0	97.9	95.8	57.9	61.1	61.1	62.1	95.8	94.7	97.9	98.9	100.0	100.0	100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	7	Niigata4-2007-JP(AB541315)
8	2.1	4.3	1.1	2.1	54.4	1.1	1.1		94.7	98.9	98.9	98.9	95.8	98.9	97.9	94.7	57.9	61.1	61.1	62.1	94.7	93.7	97.9	98.9	98.9	98.9	98.9	96.8	96.8	94.7	61.1	61.1	95.8	8	Osaka5-2007-JP(AB541327)
9	5.5	1.1	4.3	5.5	52.4	6.6	4.3	5.5		95.8	95.8	95.8	98.9	95.8	93.7	97.9	58.9	62.1	62.1	63.2	96.8	97.9	93.7	94.7	95.8	95.8	95.8	94.7	94.7	97.9	62.1	62.1	98.9	9	PC03-2006-India(EU019230)
10	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1	0.0	1.1	4.3		100.0	100.0	96.8	100.0	97.9	95.8	57.9	61.1	61.1	62.1	95.8	94.7	97.9	98.9	100.0	100.0	100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	10	Seul-2008-KOR(FJ595922)
11	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1	0.0	1.1	4.3	0.0		100.0	96.8	100.0	97.9	95.8	57.9	61.1	61.1	62.1	95.8	94.7	97.9	98.9	100.0	100.0	100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	11	Shenzhen1-2006-CHN(EU794712)
12	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1	0.0	1.1	4.3	0.0	0.0		96.8	100.0	97.9	95.8	57.9	61.1	61.1	62.1	95.8	94.7	97.9	98.9	100.0	100.0	100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	12	Shimane3-2008-JP(AB541350)
13	5.5	0.0	3.2	4.3	52.4	5.5	3.2	4.3	1.1	3.2	3.2	3.2		96.8	94.7	98.9	58.9	62.1	62.1	63.2	96.8	97.9	94.7	95.8	96.8	96.8	96.8	94.7	94.7	98.9	62.1	62.1	100.0	13	Stockholm-2002-SE(AJ626568)
14	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1	0.0	1.1	4.3	0.0	0.0	0.0	3.2		97.9	95.8	57.9	61.1	61.1	62.1	95.8	94.7	97.9	98.9	100.0	100.0	100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	14	Toyama3-2007-JP(AB541357)
15	2.1	5.5	2.1	3.2	56.6	3.2	2.1	2.1	6.6	2.1	2.1	2.1	5.5	2.1		93.7	56.8	60.0	60.0	61.1	93.7	92.6	97.9	98.9	97.9	97.9	97.9	95.8	95.8	93.7	60.0	60.0	94.7	15	VIC3863-2007-AU(GQ845322)
16	6.6	1.1	4.3	5.5	52.4	6.6	4.3	5.5	2.1	4.3	4.3	4.3	1.1	4.3	6.6		58.9	62.1	62.1	63.2	95.8	96.8	93.7	94.7	95.8	95.8	95.8	93.7	93.7	97.9	62.1	62.1	98.9	16	VIG-136-PA-BRA-2003(GU012319)
17	61.0	58.7	61.0	61.0	5.5	61.0	61.0	61.0	58.7	61.0	61.0	61.0	58.7	61.0	63.3	58.7		88.4	94.7	84.2	57.9	58.9	56.8	57.9	57.9	57.9	57.9	57.9	57.9	58.9	94.7	94.7	58.9	17	Norwalk-1968-US(M87661)
18	54.4	52.4	54.4	54.4	6.6	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	56.6	52.4	12.6		93.7	82.1	61.1	62.1	60.0	61.1	61.1	61.1	61.1	61.1	61.1	62.1	93.7	93.7	62.1	18	Chiba-1987-JP(AB042808)
19	54.4	52.4	54.4	54.4	0.0	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	56.6	52.4	5.5	6.6		85.3	61.1	62.1	60.0	61.1	61.1	61.1	61.1	61.1	61.1	62.1	100.0	100.0	62.1	19	Southampton-1993-UK(L07418)
20	52.4	50.3	52.4	52.4	16.5	52.4	52.4	52.4	50.3	52.4	52.4	52.4	50.3	52.4	54.4	50.3	17.8	20.5	16.5		62.1	63.2	61.1	62.1	62.1	62.1	62.1	62.1	62.1	63.2	85.3	85.3	63.2	20	DesertShield-2000-US(U04469)
21	4.3	3.2	4.3	5.5	54.4	6.6	4.3	5.5	3.2	4.3	4.3	4.3	3.2	4.3	6.6	4.3	61.0	54.4	54.4	52.4		96.8	93.7	94.7	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	61.1	61.1	96.8	21	Lordsdale-1993-GB(X86557)
22	5.5	2.1	5.5	6.6	52.4	7.8	5.5	6.6	2.1	5.5	5.5	5.5	2.1	5.5	7.8	3.2	58.7	52.4	52.4	50.3	3.2		92.6	93.7	94.7	94.7	94.7	94.7	94.7	98.9	62.1	62.1	97.9	22	Hawaii-1971-US(U07611)
23	2.1	5.5	2.1	3.2	56.6	3.2	2.1	2.1	6.6	2.1	2.1	2.1	5.5	2.1	2.1	6.6	63.3	56.6	56.6	54.4	6.6	7.8		98.9	97.9	97.9	97.9	95.8	95.8	93.7	60.0	60.0	94.7	23	STM2008SI(JN040477)
24	1.1	4.3	1.1	2.1	54.4	2.1	1.1	1.1	5.5	1.1	1.1	1.1	4.3	1.1	1.1	5.5	61.0	54.4	54.4	52.4	5.5	6.6	1.1		98.9	98.9	98.9	96.8	96.8	94.7	61.1	61.1	95.8	24	ST2008SI(JN040478)
25	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1	0.0	1.1	4.3	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	2.1	4.3	61.0	54.4	54.4	52.4	4.3	5.5	2.1	1.1		100.0	100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	25	DRU2007SI(JN040479)
26	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1	0.0	1.1	4.3	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	2.1	4.3	61.0	54.4	54.4	52.4	4.3	5.5	2.1	1.1	0.0		100.0	97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	26	DRU2008SI(JN040480)
27	2.1	3.2	0.0	1.1	54.4	2.1	0.0	1.1	4.3	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	2.1	4.3	61.0	54.4	54.4	52.4	4.3	5.5	2.1	1.1	0.0	0.0		97.9	97.9	95.8	61.1	61.1	96.8	27	DR2007SI(JN040481)
28	2.1	5.5	2.1	1.1	54.4	4.3	2.1	3.2	5.5	2.1	2.1	2.1	5.5	2.1	4.3	6.6	61.0	54.4	54.4	52.4	4.3	5.5	4.3	3.2	2.1	2.1	2.1		100.0	93.7	61.1	61.1	94.7	28	ST2007SI(JN040482)
29	2.1	5.5	2.1	1.1	54.4	4.3	2.1	3.2	5.5	2.1	2.1	2.1	5.5	2.1	4.3	6.6	61.0	54.4	54.4	52.4	4.3	5.5	4.3	3.2	2.1	2.1	2.1	0.0		93.7	61.1	61.1	94.7	29	SE2008SI(JN040483)
30	6.6	1.1	4.3	5.5	52.4	6.6	4.3	5.5	2.1	4.3	4.3	4.3	1.1	4.3	6.6	2.1	58.7	52.4	52.4	50.3	4.3	1.1	6.6	5.5	4.3	4.3	4.3	6.6	6.6		62.1	62.1	98.9	30	DRT2008SI(JN040484)
31	54.4	52.4	54.4	54.4	0.0	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	56.6	52.4	5.5	6.6	0.0	16.5	54.4	52.4	56.6	54.4	54.4	54.4	54.4	54.4	54.4	52.4		100.0	62.1	31	DRT2007SI(JN040485)
32	54.4	52.4	54.4	54.4	0.0	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	54.4	54.4	52.4	54.4	56.6	52.4	5.5	6.6	0.0	16.5	54.4	52.4	56.6	54.4	54.4	54.4	54.4	54.4	54.4	52.4	0.0		62.1	32	DR2008SI(JN040486)
33	5.5	0.0	3.2	4.3	52.4	5.5	3.2	4.3	1.1	3.2	3.2	3.2	0.0	3.2	5.5	1.1	58.7	52.4	52.4	50.3	3.2	2.1	5.5	4.3	3.2	3.2	3.2	5.5	5.5	1.1	52.4	52.4		33	Vannes-2000-FR(AY773210)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33		

Priloga 3: Podobnosti (%) norovirusnih nukleotidnih zaporedij med sevi izolirani iz školjk, vode in kliničnih primerov obolelih za gastroenteritisom odseka RdRp norovirusnega genoma

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
1		97.9	97.5	97.9	97.5	92.9	92.5	80.8	58.4	58.4	97.5	97.5	98.2	96.1	96.1	96.1	91.5	91.5	91.5	91.5	93.2	93.6	95.7	76.9	96.1	96.1	96.1	**1**	STM2008SI(JN040477)
2	2.2		97.5	97.9	97.9	93.2	92.9	80.4	58.7	58.7	97.5	97.5	98.9	96.8	96.8	96.8	92.5	92.5	92.5	92.5	93.6	94.0	96.4	76.2	96.8	96.8	96.8	**2**	ST2008SI(JN040478)
3	2.5	2.5		99.6	99.3	94.3	93.2	81.1	59.4	59.4	99.3	99.3	97.9	97.9	97.9	97.9	92.9	92.9	92.9	92.9	94.7	95.0	97.5	77.9	97.9	97.9	97.9	**3**	DRU2007SI(JN040479)
4	2.2	2.2	0.4		99.6	94.7	93.6	81.1	59.4	59.4	99.6	99.6	98.2	98.2	98.2	98.2	93.2	93.2	93.2	93.2	95.0	95.4	97.9	77.6	98.2	98.2	98.2	**4**	DRU2008SI(JN040480)
5	2.5	2.2	0.7	0.4		94.3	93.2	80.8	59.8	59.8	99.3	99.3	98.2	98.2	98.2	98.2	93.2	93.2	93.2	93.2	94.7	95.0	97.9	77.2	98.2	98.2	98.2	**5**	DR2007SI(JN040481)
6	7.6	7.2	6.0	5.6	6.0		94.7	79.0	58.7	58.7	94.3	94.3	92.9	92.9	92.9	92.9	96.4	96.4	96.4	97.2	96.8	97.2	93.2	77.9	92.9	92.9	92.9	**6**	ST2007SI(JN040482)
7	8.0	7.6	7.2	6.8	7.2	5.6		80.8	56.2	56.2	93.2	93.2	92.5	93.2	93.2	93.2	94.0	94.0	94.0	94.0	96.4	96.8	92.9	77.6	92.5	92.5	92.5	**7**	SE2008SI(JN040483)
8	22.6	23.1	22.2	22.2	22.6	25.5	22.8		61.2	61.2	80.8	81.1	80.1	79.7	79.7	79.7	81.5	81.5	81.5	80.4	80.8	81.1	79.4	78.3	79.7	79.7	79.7	**8**	DRT2008SI(JN040484)
9	59.2	58.4	56.9	56.9	56.1	58.4	60.8	56.2		100.0	59.8	59.4	58.7	59.1	59.1	59.1	59.1	59.1	59.1	59.4	58.0	58.4	58.7	57.7	58.7	59.8	59.8	**9**	DRT2007SI(JN040485)
10	59.2	58.4	56.9	56.9	56.1	58.4	60.8	56.2	0.0		59.8	59.4	58.7	59.1	59.1	59.1	59.1	59.1	59.1	59.4	58.0	58.4	58.7	57.7	58.7	59.8	59.8	**10**	DR2008SI(JN040486)
11	2.5	2.5	0.7	0.4	0.7	6.0	7.2	22.6	56.1	56.1		99.3	97.9	97.9	97.9	97.9	92.9	92.9	92.9	92.9	94.7	95.0	97.5	77.2	97.9	97.9	97.9	**11**	V17-08(JF830567)
12	2.5	2.5	0.7	0.4	0.7	6.0	7.2	22.1	56.9	56.9	0.7		97.9	98.6	98.6	98.6	92.9	92.9	92.9	92.9	94.7	95.0	98.2	77.6	98.6	98.2	98.2	**12**	580-07(JF830570)
13	1.8	1.1	2.2	1.8	1.8	7.6	8.0	23.7	58.4	58.4	2.2	2.2		97.2	97.2	97.2	92.2	92.2	92.2	92.2	93.2	93.6	96.8	77.2	97.2	97.2	97.2	**13**	1732-07(JF830568)
14	4.1	3.3	2.2	1.8	1.8	7.6	7.2	24.2	57.6	57.6	2.2	1.4	2.9		100.0	100.0	92.2	92.2	92.2	92.2	94.0	94.3	98.9	76.9	99.3	98.9	98.9	**14**	2791-09(JF830573)
15	4.1	3.3	2.2	1.8	1.8	7.6	7.2	24.2	57.6	57.6	2.2	1.4	2.9	0.0		100.0	92.2	92.2	92.2	92.2	94.0	94.3	98.9	76.9	99.3	98.9	98.9	**15**	2830-09(JF830574)
16	4.1	3.3	2.2	1.8	1.8	7.6	7.2	24.2	57.6	57.6	2.2	1.4	2.9	0.0	0.0		92.2	92.2	92.2	92.2	94.0	94.3	98.9	76.9	99.3	98.9	98.9	**16**	2889-09(JF830575)
17	9.3	8.0	7.6	7.2	7.2	3.7	6.4	21.7	57.6	57.6	7.6	7.6	8.4	8.4	8.4	8.4		100.0	100.0	97.9	96.8	97.2	92.5	79.0	92.2	92.2	92.2	**17**	757-10(JF830576)
18	9.3	8.0	7.6	7.2	7.2	3.7	6.4	21.7	57.6	57.6	7.6	7.6	8.4	8.4	8.4	8.4	0.0		100.0	97.9	96.8	97.2	92.5	79.0	92.2	92.2	92.2	**18**	756-10(JF830577)
19	9.3	8.0	7.6	7.2	7.2	3.7	6.4	21.7	57.6	57.6	7.6	7.6	8.4	8.4	8.4	8.4	0.0	0.0		97.9	96.8	97.2	92.5	79.0	92.2	92.2	92.2	**19**	755-10(JF830578)
20	9.3	8.0	7.6	7.2	7.2	2.9	6.4	23.3	56.9	56.9	7.6	7.6	8.4	8.4	8.4	8.4	2.2	2.2	2.2		96.8	97.2	92.5	78.3	92.2	92.2	92.2	**20**	220-10(JF830579)
21	7.2	6.8	5.6	5.2	5.6	3.3	3.7	22.7	60.0	60.0	5.6	5.6	7.2	6.4	6.4	6.4	3.3	3.3	3.3	3.3		99.6	94.3	78.6	94.0	94.0	94.0	**21**	290-05(JF830571)
22	6.8	6.4	5.2	4.8	5.2	2.9	3.3	22.3	59.2	59.2	5.2	5.2	6.8	6.0	6.0	6.0	2.9	2.9	2.9	2.9	0.4		94.7	79.0	94.3	94.3	94.3	**22**	288-05(JF830572)
23	4.4	3.7	2.5	2.2	2.2	7.2	7.6	24.7	58.4	58.4	2.5	1.8	3.3	1.1	1.1	1.1	8.0	8.0	8.0	8.0	6.0	5.6		77.6	99.6	98.6	98.6	**23**	V2-09(JF830563)
24	28.2	29.4	26.6	27.2	27.7	26.7	27.3	26.0	60.8	60.8	27.7	27.1	27.7	28.2	28.2	28.2	25.1	25.1	25.1	26.2	25.6	25.1	27.1		77.6	77.6	77.6	**24**	V1-09(JF830562)
25	4.1	3.3	2.2	1.8	1.8	7.6	8.0	24.2	58.4	58.4	2.2	1.4	2.9	0.7	0.7	0.7	8.4	8.4	8.4	8.4	6.4	6.0	0.4	27.1		98.9	98.9	**25**	V47-09(JF830566)
26	4.1	3.3	2.2	1.8	1.8	7.6	8.0	24.2	56.1	56.1	2.2	1.8	2.9	1.1	1.1	1.1	8.4	8.4	8.4	8.4	6.4	6.0	1.4	27.1	1.1		100.0	**26**	V3-09(JF830564)
27	4.1	3.3	2.2	1.8	1.8	7.6	8.0	24.2	56.1	56.1	2.2	1.8	2.9	1.1	1.1	1.1	8.4	8.4	8.4	8.4	6.4	6.0	1.4	27.1	1.1	0.0		**27**	V7-09(JF830565)
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**		

Priloga 4: Podobnosti (%) norovirusnih aminokislinskih zaporedij med sevi izolirani iz školjk, vode in kliničnih primerov obolelih za gastroenteritisom odseka RdRp norovirusnega genoma

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
1		98.9	97.8	97.8	97.8	95.7	95.7	93.5	59.1	59.1	96.8	97.8	98.9	97.8	97.8	97.8	95.7	95.7	95.7	95.7	94.6	95.7	96.8	90.3	97.8	97.8	97.8	**1**	STM2008SI(JN040477)
2	1.1		98.9	98.9	98.9	96.8	96.8	94.6	60.2	60.2	97.8	98.9	100.0	98.9	98.9	98.9	96.8	96.8	96.8	96.8	95.7	96.8	97.8	91.4	98.9	98.9	98.9	**2**	ST2008SI(JN040478)
3	2.2	1.1		100.0	100.0	97.8	97.8	95.7	60.2	60.2	98.9	100.0	98.9	100.0	100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	96.8	97.8	98.9	92.5	100.0	100.0	100.0	**3**	DRU2007SI(JN040479)
4	2.2	1.1	0.0		100.0	97.8	97.8	95.7	60.2	60.2	98.9	100.0	98.9	100.0	100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	96.8	97.8	98.9	92.5	100.0	100.0	100.0	**4**	DRU2008SI(JN040480)
5	2.2	1.1	0.0	0.0		97.8	97.8	95.7	60.2	60.2	98.9	100.0	98.9	100.0	100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	96.8	97.8	98.9	92.5	100.0	100.0	100.0	**5**	DR2007SI(JN040481)
6	4.4	3.3	2.2	2.2	2.2		100.0	93.5	60.2	60.2	96.8	97.8	96.8	97.8	97.8	97.8	100.0	100.0	100.0	100.0	98.9	100.0	98.9	91.4	97.8	97.8	97.8	**6**	ST2007SI(JN040482)
7	4.4	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0		93.5	60.2	60.2	96.8	97.8	96.8	97.8	97.8	97.8	100.0	100.0	100.0	100.0	98.9	100.0	98.9	91.4	97.8	97.8	97.8	**7**	SE2008SI(JN040483)
8	6.8	5.6	4.4	4.4	4.4	6.8	6.8		61.3	61.3	94.6	95.7	94.6	95.7	95.7	95.7	93.5	93.5	93.5	93.5	92.5	93.5	94.6	92.5	95.7	95.7	95.7	**8**	DRT2008SI(JN040484)
9	56.1	54.0	54.0	54.0	54.0	54.0	54.0	51.9		100.0	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	59.1	60.2	60.2	59.1	60.2	60.2	60.2	**9**	DRT2007SI(JN040485)
10	56.1	54.0	54.0	54.0	54.0	54.0	54.0	51.9	0.0		60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	60.2	59.1	60.2	60.2	59.1	60.2	60.2	60.2	**10**	DR2008SI(JN040486)
11	3.3	2.2	1.1	1.1	1.1	3.3	3.3	5.6	54.0	54.0		98.9	97.8	98.9	98.9	98.9	96.8	96.8	96.8	96.8	95.7	96.8	97.8	91.4	98.9	98.9	98.9	**11**	V17-08(JF830567)
12	2.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	4.4	54.0	54.0	1.1		98.9	100.0	100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	96.8	97.8	98.9	92.5	100.0	100.0	100.0	**12**	580-07(JF830570)
13	1.1	0.0	1.1	1.1	1.1	3.3	3.3	5.6	54.0	54.0	2.2	1.1		98.9	98.9	98.9	96.8	96.8	96.8	96.8	95.7	96.8	97.8	91.4	98.9	98.9	98.9	**13**	1732-07(JF830568)
14	2.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	4.4	54.0	54.0	1.1	0.0	1.1		100.0	100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	96.8	97.8	98.9	92.5	100.0	100.0	100.0	**14**	2791-09(JF830573)
15	2.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	4.4	54.0	54.0	1.1	0.0	1.1	0.0		100.0	97.8	97.8	97.8	97.8	96.8	97.8	98.9	92.5	100.0	100.0	100.0	**15**	2830-09(JF830574)
16	2.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	4.4	54.0	54.0	1.1	0.0	1.1	0.0	0.0		97.8	97.8	97.8	97.8	96.8	97.8	98.9	92.5	100.0	100.0	100.0	**16**	2889-09(JF830575)
17	4.4	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	6.8	54.0	54.0	3.3	2.2	3.3	2.2	2.2	2.2		100.0	100.0	100.0	98.9	100.0	98.9	91.4	97.8	97.8	97.8	**17**	757-10(JF830576)
18	4.4	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	6.8	54.0	54.0	3.3	2.2	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0		100.0	100.0	98.9	100.0	98.9	91.4	97.8	97.8	97.8	**18**	756-10(JF830577)
19	4.4	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	6.8	54.0	54.0	3.3	2.2	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0		100.0	98.9	100.0	98.9	91.4	97.8	97.8	97.8	**19**	755-10(JF830578)
20	4.4	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	6.8	54.0	54.0	3.3	2.2	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	0.0		98.9	100.0	98.9	91.4	97.8	97.8	97.8	**20**	220-10(JF830579)
21	5.6	4.4	3.3	3.3	3.3	1.1	1.1	7.9	56.1	56.1	4.4	3.3	4.4	3.3	3.3	3.3	1.1	1.1	1.1	1.1		98.9	97.8	90.3	96.8	96.8	96.8	**21**	290-05(JF830571)
22	4.4	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	6.8	54.0	54.0	3.3	2.2	3.3	2.2	2.2	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1		98.9	91.4	97.8	97.8	97.8	**22**	288-05(JF830572)
23	3.3	2.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	5.6	54.0	54.0	2.2	1.1	2.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	2.2	1.1		92.5	98.9	98.9	98.9	**23**	V2-09(JF830563)
24	10.4	9.2	7.9	7.9	7.9	9.2	9.2	7.9	56.1	56.1	9.2	7.9	9.2	7.9	7.9	7.9	9.2	9.2	9.2	9.2	10.4	9.2	7.9		92.5	92.5	92.5	**24**	V1-09(JF830562)
25	2.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	4.4	54.0	54.0	1.1	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	2.2	2.2	3.3	2.2	1.1	7.9		100.0	100.0	**25**	V47-09(JF830566)
26	2.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	4.4	54.0	54.0	1.1	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	2.2	2.2	3.3	2.2	1.1	7.9	0.0		100.0	**26**	V3-09(JF830564)
27	2.2	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	4.4	54.0	54.0	1.1	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	2.2	2.2	2.2	2.2	3.3	2.2	1.1	7.9	0.0	0.0		**27**	V7-09(JF830565)
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**		

Priloga 5: Podobnosti (%) norovirusnih nukleotidnih zaporedij kapsidnega dela norovirusnega genoma

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
1		74.7	75.3	91.7	75.0	75.3	74.7	75.3	100.0	99.7	99.7	99.7	99.7	99.3	98.6	98.6	99.0	**1**	DRT2006SI(JN689231)
2	31.5		89.6	76.4	99.0	98.6	98.6	97.9	74.7	75.0	75.0	75.0	75.0	74.7	75.3	75.3	75.3	**2**	PIR2008SI(JN689232)
3	30.5	11.3		77.4	89.9	90.3	90.3	89.6	75.3	75.3	75.3	75.3	75.3	75.0	75.7	75.7	75.7	**3**	DesertShield(U04469)
4	9.1	28.7	27.2		76.7	76.4	77.1	75.7	91.7	92.0	92.0	92.0	92.0	91.7	92.4	91.7	92.0	**4**	Norwalk(M87661)
5	30.9	1.0	10.9	28.2		99.0	99.0	98.3	75.0	75.3	75.3	75.3	75.3	75.0	75.7	75.7	75.7	**5**	C2-2008-SGP(HM209170)
6	30.4	1.4	10.5	28.8	1.0		98.6	99.3	75.3	75.7	75.7	75.7	75.7	75.3	76.0	76.0	76.0	**6**	OC-2002-JP(AB545178)
7	31.5	1.4	10.5	27.7	1.0	1.4		97.9	74.7	75.0	75.0	75.0	75.0	74.7	75.3	75.3	75.3	**7**	NSB-2009-RUS(GU138161)
8	30.4	2.1	11.4	29.9	1.8	0.7	2.1		75.3	75.7	75.7	75.7	75.7	75.3	76.0	76.0	76.0	**8**	Gunma-2004-JP(AB246128)
9	0.0	31.5	30.5	9.1	30.9	30.4	31.5	30.4		99.7	99.7	99.7	99.7	99.3	98.6	98.6	99.0	**9**	Stromstad-2007-SE(FJ384783)
10	0.3	30.9	30.5	8.7	30.3	29.8	31.0	29.8	0.3		100.0	100.0	100.0	99.7	99.0	99.0	99.3	**10**	Guangxi-2010-CHN(HM241691)
11	0.3	30.9	30.5	8.7	30.3	29.8	31.0	29.8	0.3	0.0		100.0	100.0	99.7	99.0	99.0	99.3	**11**	C1-2006-SGP(FJ788358)
12	0.3	30.9	30.5	8.7	30.3	29.8	31.0	29.8	0.3	0.0	0.0		100.0	99.7	99.0	99.0	99.3	**12**	Delsjo-2004-SE(EU085529)
13	0.3	30.9	30.5	8.7	30.3	29.8	31.0	29.8	0.3	0.0	0.0	0.0		99.7	99.0	99.0	99.3	**13**	musselsFoto-2004-SE(EU085523)
14	0.7	31.5	31.0	9.1	30.9	30.4	31.5	30.4	0.7	0.3	0.3	0.3	0.3		98.6	98.6	99.0	**14**	wastewater-2006-JP(AB597451)
15	1.4	30.3	29.9	8.3	29.8	29.3	30.4	29.3	1.4	1.1	1.1	1.1	1.1	1.4		97.9	98.3	**15**	clamShimane-2008-JP(AB522418)
16	1.4	30.3	29.9	9.1	29.8	29.3	30.4	29.3	1.4	1.1	1.1	1.1	1.1	1.4	2.1		99.7	**16**	oysterYamaguchi-2005-JP(AB262157)
17	1.1	30.3	29.9	8.7	29.8	29.3	30.4	29.3	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	1.1	1.8	0.3		**17**	clamShijimi-2008-JP(EF424516)
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**		

Priloga 6: Podobnosti (%) norovirusnih aminokislinskih zaporedij kapsidnega dela norovirusnega genoma

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
1		77.1	76.0	100.0	76.0	77.1	77.1	77.1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	**1**	DRT2006SI(JN689231)
2	27.4		97.9	77.1	97.9	99.0	99.0	99.0	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	76.0	77.1	77.1	**2**	PIR2008SI(JN689232)
3	28.9	2.1		76.0	97.9	99.0	99.0	99.0	76.0	76.0	76.0	76.0	76.0	76.0	75.0	76.0	76.0	**3**	DesertShield(U04469)
4	0.0	27.4	28.9		76.0	77.1	77.1	77.1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	**4**	Norwalk(M87661)
5	28.9	2.1	2.1	28.9		99.0	99.0	99.0	76.0	76.0	76.0	76.0	76.0	76.0	75.0	76.0	76.0	**5**	C2-2008-SGP(HM209170)
6	27.4	1.0	1.0	27.4	1.0		100.0	100.0	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	76.0	77.1	77.1	**6**	OC-2002-JP(AB545178)
7	27.4	1.0	1.0	27.4	1.0	0.0		100.0	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	76.0	77.1	77.1	**7**	NSB-2009-RUS(GU138161)
8	27.4	1.0	1.0	27.4	1.0	0.0	0.0		77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	77.1	76.0	77.1	77.1	**8**	Gunma-2004-JP(AB246128)
9	0.0	27.4	28.9	0.0	28.9	27.4	27.4	27.4		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	**9**	Stromstad-2007-SE(FJ384783)
10	0.0	27.4	28.9	0.0	28.9	27.4	27.4	27.4	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	**10**	Guangxi-2010-CHN(HM241691)
11	0.0	27.4	28.9	0.0	28.9	27.4	27.4	27.4	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	**11**	C1-2006-SGP(FJ788358)
12	0.0	27.4	28.9	0.0	28.9	27.4	27.4	27.4	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	**12**	Delsjo-2004-SE(EU085529)
13	0.0	27.4	28.9	0.0	28.9	27.4	27.4	27.4	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.0	99.0	100.0	**13**	musselsFoto-2004-SE(EU085523)
14	0.0	27.4	28.9	0.0	28.9	27.4	27.4	27.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.0	99.0	100.0	**14**	wastewater-2006-JP(AB597451)
15	1.0	28.9	30.4	1.0	30.4	28.9	28.9	28.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		97.9	99.0	**15**	clamShimane-2008-JP(AB522418)
16	1.0	27.4	28.9	1.0	28.9	27.4	27.4	27.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.1		99.0	**16**	oysterYamaguchi-2005-JP(AB262157)
17	0.0	27.4	28.9	0.0	28.9	27.4	27.4	27.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0		**17**	clamShijimi-2008-JP(EF424516)
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**		