

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »ZNANJE ZA VARNOST IN MIR 2006 – 2010«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv področja v okviru CRP:

3. Obramba proti terorizmu, zaščita ljudi in okolja

2. Šifra projekta:

M1 0145

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Razvoj metod za določanje virusov v pitnih vodah v primeru terorističnega napada in naravnih nesrečah

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Development of methods for the detection of virus in potable drinking waters in case of terrorist attack and natural disaster

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

PCR v realnem času, rotavirus, monoliti, koncentriranje, detekcija

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Real time PCR, rotavirus, monoliths, concentration, detection

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Nacionalni inštitut za biologijo

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

-BIA Separations d.o.o. (BIA).
-UL, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo (IMI).
-Zavod za zdravstveno varstvo, Maribor (ZZV).

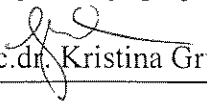
6. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

12688


Kristina Gruden

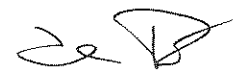
Datum: 30-11-2008

Podpis vodje projekta:


Doc.dr. Kristina Gruden

Podpis in žig izvajalca:


Prof.dr. Tamara Lah Turnšek



II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Opisujemo vse planirane naloge, ki smo jih realizirali v tekom projekta. Posamezni sklopi so bili opravljeni v sodelovanju projektnih partnerjev Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB), Inštituta za mikrobiologijo (IMI), podjetja BIA Separations d.o.o. (BIA) in Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor (ZZV). Ves potek raziskave kakor tudi komunikacija in sodelovanje med različnimi partnerji je bilo izredno plodno in je teklo gladko z veliko raziskovalnega entuziazma in dobrega sodelovanja, kar je izredno pomembno za tako kompleksen projekt s prepletenimi nalogami posameznih partnerjev. Okužbe ljudi, živali in rastlin s gastroenteričnimi virusi (na primer Rotavirus) preko voda predstavljajo velik problem tako v mirnem času, še bolj pa v primeru naravnih nesreč kot so poplave in potresi, ko se pomešajo pitne vode s fekalnimi. Različni vodotoki, še posebno viri pitne vode, so lahek način namerne kontaminacije - okužbe in predstavljajo primerno tarčo za različne oblike terorizma in v primeru kontaminacije z patogenimi mikroorganizmi – bioterizma. Pomembna značilnost mikroorganizmov, še zlasti patogenih virusov je, da so infektivni in lahko povzročajo bolezni v zelo nizkih koncentracijah, ki so večinoma pod mejami detekcije splošno uporabljenih metod določanja mikroorganizmov. Zato je potrebno uporabljati zelo občutljive detekcijske metode, poleg tega pa je potrebno vzorce vode predhodno koncentrirati. Tudi v Sloveniji smo že dokazali epidemijo povzročeno z Rotavirusi, katere izvor je bila pitna voda. Predlagani projekt si je zastavil za cilj razvoj metod za določanje izredno nizkih koncentracij patogenih virusov v vodah s pomočjo uvedbe PCR v realnem času, ki je do sedaj najobčutljivejša metoda za določanje nukleinskih kislin. Za predhodno koncentriranje virusov smo priredili kromatografsko metodo s CIM monolitnimi kromatografskimi nosilci, pionirsko tehnologijo v svetovnem merilu, razvito v Sloveniji, ki s svojimi vrhunskimi lastnostmi zagotavljajo izredno hitro in učinkovito koncentriranje virusov.

SKLOP 1. - razvoj in validacija metode PCR v realnem času za opisane patogene viruse ter primerjava določanja virusov s klasično in novo metodo.

Delo je potekalo vsa tri leta

Naloga: 1.1 Priprava kontrolnega vzorca za razvoj metod (1-3 mesec)

Naloga 1.2 Zbiranje in karakterizacija vzorcev okuženih z enteričnimi virusi, (1-30 mesec)

Naloga 1.3 Razvoj PCR v realnem času za enterične viruse (2 reprezentativna gena za posamezen virus) (1-12 mesec) 1. mejnik

Naloga 1.4 Validacija PCR v realnem času za enterične viruse in primerjava z obstoječo metodiko (3 – 18 mesec) 2.mejnik

Naloga 1.5 Prireditev metode za določanje v vodovodni vodi in okoljskih vzorcih (12-21 mesec) 3. mejnik

Naloga 1.6 Določanje virusov v okoljskih vzorcih, 2 – 3 mesece v drugem in tretjem letu projekta (18- 30 mesec).

V okviru Sklopa 1, so bile skladno s programom naloge 1.1 in 1.2, zaključene že v letu 2006, medtem ko je bila naloga 1.4 delno dokončana, naloga 1.3 pa je tekla ves čas trajanja projekta. Tekom leta 2007 smo zaključili nalogo 1.4 in 1.5., in v letu 2008 smo

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

zaključili še nalogo 1.6.

V prvih mesecih projekta je NIB ob tesnem sodelovanju z IMI pričel z bioinformatško obdelavo genomov Rotavirusov z namenom izdelati strategijo za njihovo detekcijo. (Naloga 1.3.). IMI je pripravil podatke o različnih sekvencah DNA, ki so na voljo v javno dostopnih bazah kakor tudi izdelane iz lastnih izolatov diagnostičnih vzorcev. Široko zastavljena baza nukleotidnih zaporedij je vključevala različne gene rotavirusov: predvsem strukturne gene VP2, VP3 in VP6, ki so lastni virusnim izolatom človeka, govedu, prašičev, itd. (Naloga 1.1). Glede na zbrana dostopna nukleotidna zaporedja je NIB pripravil začetne oligonukleotidne začetnike in hibridizacijske sonde za 5 različnih pristopov za 3 gene za razvoj PCR v realnem času. Najbolj univerzalen pristop je temeljil na "Sybergreen" kemiji, medtem ko so ostali štirje bazirali na "TaqMan" kemiji. Da bi zadostili pogoju, da z enim pristopom v testiranje zajamemo kar največ različnih izolatov rotavirusov za katere je znana izredna genska pestrost, smo pripravili mešanice oligonukleotidnih začetnikov, ki bi jih lahko uporabimo v enem testu. Skupno smo izdelali 28 oligonukleotidnih začetnikov in 4 hibridizacijske Taqman sonde. Pristop s "Sybergreen-om" s katerim ciljamo VP6 gen je bil izdelan da bi pokrili čim širšo paleto rotavirusnih izolatov: to je 18 izolatov različnih gostiteljev (človeka in različnih živali). Ta test je bil pripravljen, da bi ga lahko uporabili kot presejalni test. Ostali Taqman testi pa so bili pripravljeni tako, da bi pokrili kar največ izolatov iz človeka. Na primer pristop za določanje gena VP2 je bil izdelan z upoštevanjem 7 različnih virusnih izolatov, ki so bili izolirani iz človeka. Sintetizirali smo 5 smiselni in 2 protismiselna oligonukleotidna začetnika, ki so nam omogočili 10 možnih kombinacij in povečali možnost da določimo s testom čim več različnih genskih variant virusa. (Naloga 1.3.).

IMI je iz množice zbranih in okarakteriziranih vzorcev pripravil vzorce rotavirusov za testiranje pripravljenih pristopov s PCR v realnem času. Vzorci so bili pregledani poleg s klasičnim RT-PCR, tudi z elektronskim mikroskopom in serološkim ELISA testom. Z RT-PCR in nested PCR, ki mu je sledilo določanje nukleotidnega zaporedja pomnoženih produktov so v vzorcih določili genotipe G1P8, G2P4, G3P8, G4P8, G8P8, G9P8 in G12P8. Vsi vzorci so bili na NIB testirani z različnimi pripravljenimi pristopi PCR v realnem času. Najbolj gensko variabilna genotipa G1P8 in G2P4 sta bila izbrana (Naloga 1.2.) za ugotavljanje ali pripravljene testi pokrivajo najširši spekter virusnih genotipov. Medtem ko se je IMI predvsem osredotočal na dobro karakterizirane virusne izolate je ZZV v prvem obdobju projekta predvsem zbiral okoljske vzorce za nadaljnje analize (Naloga 1.2).

Po zaključenem preizkušanju vseh pristopov PCR v realnem času smo najboljše rezultate dobili z analizo genov Vp2 in Vp6, kjer smo lahko določili tudi gensko najbolj variabilna genotipa G1P8 in G2P4. Testirali smo tudi vzorec, ki je vseboval mešanico različnih genotipskih izolatov, ki ga je pripravil IMI in je služil tudi za nadaljne poskuse koncentriranja virusa z monolitnimi kromatografskimi nosilci. Vzorec smo redčili z zaporednimi desetkratnimi redčitvami in viruse v vzorcu določili z več kot 90% učinkovitostjo in limito detekcije (LOD) cca 9650 virusnih delcev na ml pripravljenega vzorca, oziroma manj kot 10 virusnih delcev na analizno reakcijo (10 µl).

V okviru naloge 1.4 (validacija PCR v realnem času za enterične viruse in primerjava z obstoječo metodologijo) je NIB v tesnem sodelovanju z IMI, analiziral 139 humanih vzorcev, okuženih z rotavirusi. Med njimi je bilo 121 vzorcev okuženih s humanimi, 12 z govejimi in 6 s prašičjimi rotavirusi. Vsi vzorci so se izkazali kot pozitivni z uporabo novo razvite qPCR metode, ki ima izredno visoko občutljivost. Pomembno je, da smo dokazali vse izvore rotavirusov, saj lahko vsi kontaminirajo okolje in pitne vode. Analizirali smo tudi 10 vzorcev, ki so se po klasični metodi izkazali kot negativni in 10 vzorcev okuženih z drugimi enteričnimi virusi. Rezultati kažejo na večjo občutljivost

nove metode, saj smo izmed 10 negativnih vzorcev našli dodatno pozitivno, hkrati pa nakazujejo da je nova metoda zelo nespecifična, saj ne zaznava prisotnosti drugih virusov. Po končanem testiranju vzorcev s PCR v realnem času, smo metodo primerjali tudi z ELISA testom in vgnezdno RT-PCR, ki se obe uporabljata kot rutinski za diagnostiko vzorcev pacientov na IMI. Ugotovili smo, da je novo razvita metoda vsaj za en velikostni razred bolj občutljiva od konvencionalnega PCR in za 5 velikostnih razredov od ELISA. Dodatne ugodnosti pa so tudi velika hitrost, zmanjšana možnost navzkrižne kontaminacije med vzorci in možnost določanje velikega števila vzorcev hkrati na terenu.

Za izvedbo naloge 1.5 (prireditev metode za določanje virusov v vodovodni vodi in okoljskih vzorcih) smo različne izolate rotavirusov redčili v različnih koncentracijah v pufru, tekoči vodi in vodi iz vodotoka Glinščica. Z novo metodo smo viruse določili v enakem številu v vseh treh preizkušeni medijih. Ko smo potrdili da metoda deluje na vzorcih okoljskih voda, smo v analizo vključili različne vzorce odvzete iz rek in jezer (Drava, Krka, Vogrscsek), kakor tudi vzorce vodovodne vode po poplavah v letu 2007(Črnuče, Ljubljana). V večini primerov so bili vzorci negativni na rotaviruse, kar je bilo posledica nizke koncentracije virusov v vzorcih. Po uporabi metode koncentriranja s CIM kromatografskimi nosilci, ki smo jo razvili tekom projekta (glej spodaj), smo v več vzorcih določili rotaviruse z metodo PCR v realnem času.

SKLOP 2. - razvoj koncentriranja virusov s CIM kromatografskimi nosilci ter primerjava učinkovitosti koncentriranja izbranih virusov z znano in novo razvito metodo
Delo je potekalo od 3 – 27 meseca projekta.

Naloga 2.1 Razvoj koncentriranja enteričnih virusov s CIM kromatografskimi nosilci ter optimizacija ločbe (faktorji ločbe kot so: vpliv različnega pH, koncentracije soli, koncentracije virusa, temperature in tipa ionskega izmenjevalca za posamezen virus) s pomočjo kontrole virusov s kvantificiranjem eluatov s PCR v realnem času (3 - 27 mesec)
4. mejnik

Naloga 2.2. Primerjava koncentriranja virusov z obstoječo metodo (Ultrafiltracija in koncentracija z Viva flow 200 in Vivcell 50, Sartorius) in CIM kromatografskimi nosilci (18 – 27 mesec) 5. mejnik

V BIA Separations so se aktivnosti začele z določanjem pogojev vezave in elucije rotavirusov na CIM kromatografskih nosilcih (Naloga 2.1). Na osnovi uspešnega predhodnega dela z drugimi virusnimi delci smo za stacionarno fazo (kromatografski nosilec) v uvodnih poskusih izbrali močan anionski izmenjevalec (QA). Monolitne kolone zaradi svojih strukturnih značilnosti omogočajo konvektivni masni prenos in s tem od pretoka neodvisne lastnosti. Zaradi pretočnih kanalov je tudi velikim molekulam in virusnim delcem dostopna praktično vsa aktivna površina, kar ima za posledico visoko kapaciteto za viruse. Zaradi omenjenih lastnosti smo se odločili za uporabo CIM QA monolitnih kolon. Ker je teoretično izračunana izolektrična točka rotavirusnega delca v kislem območju, smo kot mobilno fazo izbrali puferski sistem HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonično kislino) ali pa fosfatni pufer z nevtralnimi pH 7. Za kromatografsko čiščenje rotavirusov smo uporabili sistem HPLC (visokoločljivostna tekočinska kromatografija), ki omogoča natančno nastavljanje pogojev vezave in elucije virusa na kromatografsko kolono.

Vzorci z znano količino virusov je pripravil IMI, koncentracijo virusa pa smo določili z uporabo elektronske mikroskopije in latexnih delcev znane velikosti in koncentracije. Vzorce smo na NIB testirali s kvantitativnim PCR v realnem času, da smo s pomočjo redčitvene vrste izdelali kalibracijsko krivuljo, ki je omogočila kvantificiranje virusov dobljenih v različnih frakcijah po koncentriranju s kromatografijo.

Vzorci, ki smo jih zaradi njihove visoke ionske jakosti predhodno redčili z mobilno fazo, smo injicirali na CIM QA disk monolitno kolono. Vezane rotavirusne delce smo v različnih poskusih eluirali v linearnem in stopenjskem gradientu NaCl. Tako zbrane frakcije so bile analizirane z kvalitativnimi (ELISA in EM) in kvantitativnimi (PCR v realnem času) metodami v IMI in NIB. Ugotovili smo, da se mešanica rotavirusov pod danimi pogoji veže na CIM QA kromatografski nosilec in z njega tudi eluira. Potem smo izvedli več poskusov nalaganja rotavirusov na CIM diske, pripravljene iz različnih anionskih in kationskih izmenjevalcev, uporabljali različne pufre, pH z namenom temeljito optimizirati vezavo virusa in spiranje v procesu koncentriranja. Najboljše rezultate, skoraj 100% virusni koncentrat, smo dosegli z uporabo QA CIM diskov, 50 mM fosfatnega pufra pH 7 kot nosilnega pufra in 1M NaCl za spiranje vezanih virusov z diska. Za nalogo 2.2 smo pripravili 4 vzorce po 1 liter vodovodne vode, v kateri smo redčili viruse v različnih koncentracijah. Te vzorce smo primerjalno koncentrirali na sistemu QA 8 ml CIM koloni, in Viva flow/Viva celici, ki je predstavljala utečen sistem v diagnostičnem laboratoriju IMI. Količina virusa v vseh frakcijah je bila določena z novo kvantitativno metodo PCR v realnem času. Eksperiment smo ponovili dvakrat v 3 mesečnem presledku z namenom ugotoviti ponovljivost rezultatov. V vseh primerih je CIM tehnologija koncentrirala rotaviruse 50-80 krat, medtem ko ih je VIVA sistem le 10-20 krat, kar pomeni, da CIM sistem deluje 4-5 krat bolje kot VIVA.

SKLOP 3. – Izvedba določanja virusov v diagnostičnem laboratoriju in na mestu vzorčenja ter diseminacija rezultatov

Delo je potekalo od 12 – 30 meseca izvedbe projekta

Naloga 3.1 Prenos metodike v laboratorij Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor ter izvedba primerjalnih medlaboratorijski testov (18 – 30 mesec) 6.mejnik

Naloga 3.2 Izvedba diagnostike na terenu z uporabo modelnega virusa (18 – 30 mesec) 7. mejnik

Naloga 3. 3 Diseminacija rezultatov (27-30 mesec) (dokončna priprava protokolov za diagnostiko in vzorčenje ter prikaz metodike zainteresiranim uporabnikom) 8.mejnik

Izobraževanje sodelavcev na ZZV se je pričelo z izvedbo izmenjave protokolov med NIB in ZZV. Na NIB smo organizirali laboratorijsko delavnico (2 in 3 april 2008) v kateri smo poskrbeli za prenos rezultatov; vse partnerje v projektu seznanili z metodo izolacije RNA, eno in dvo stopenjsko RT-qPCR detekcijo in relativno kvantifikacijo rotavirusov v okoljskih vodah in analizo rezultatov (Naloga 3.1). Primerjalne medlaboratorijske analize, ki so vključevale NIB, ZZV in Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo so bili uspešno realizirane mesecu novembru 2008 (naloga 3.1).

Detekcijo s PCR v realnem času smo priredili za potrebe določanja na terenu. Z uporabo Quiagen RNA izolacijskega kita, eno stopenjskega RT-qPCR in SmartCycler prenosnega sistema smo skrajšali čas od priprave vzorce do rezultata iz 6h na 2h30min. Prvi terenski poskus smo uspešno izvedli v aprilu 2008 (Naloga 3.2). Drugi terenski poskus je bil uspešno izveden v novembra 2008 in tokrat je bil organiziran kot delavnica, kjer so bili prisotni specialisti Uprave za zaščito in reševanje, med njimi tudi vsebinski spremljevalec projekta. Udeleženci delavnice so si ogledali vse korake pri koncentriranju in določanju rotavirusov na terenu.

Tekom projekta smo pripravili protokol za izolacijo rotavirusne RNA, detekcijo in določanje količine rotavirusov z PCR v realnem času (v enem koraku in dveh korakih). Protokoli so bili pripravljene v skladu z sistemom kakovosti ISO 17025, ki ga vzdržujemo na NIB in bili posredovani IMI in ZZV za nadaljnjo uporabo. Tekom projekta smo na NIB

organizirali več različnih delavnic. Nekatere smo organizirali za prenos znanja ali za posredovanje razvitih metod med partnerji, druge pa so bile organizirane z namenom seznaniti predstavnike Ministrstva za obrambo in Uprave za Zaščito in reševanje RS. Bolj natančen opis o različnih delavnicah je podan pod točko 6 tega poročila. Rezultati projekta so bili posredovani preko znanstvenih člankov, objavljenih v revijah z visokim impakt faktorjem in preko različnih predavanj in posterjev na mednarodnih in nacionalnih znanstvenih srečanjih. Bolj natančna informacija o bibliografskih podatkih je podana v točki 5 tega poročila. Tekom projekta se je Slovenija vključila v evropski projekt COST 929 (A European network of Food and Environmental Virology), kamor je bil povabljen NIB in je koordinatorsvo za Slovenijo prevzel član projektne skupine Ion Gutierrez Aguirre (NIB), prav tako pa je vključen tudi IMI s članom projektne skupine Andrejem Steyerjem. Tako smo sodelovali na sestanku COST akcije v letu 2007 in predavali o rezultatih projekta na kongresu, ki ga je organiziral COST v letu 2008. Ta evropska iniciativa predstavlja idealen okvir za diseminacijo rezultatov projekta in izmenjavo znanj. Tekom projekta smo organizirali poleg delavnic tudi osem sestankov projektnih partnerjev z namenom načrtovanja in obravnave rezultatov projekta (5 sestankov v 2006, 2 sestanka v 2007 in zadnji sestanek v letu 2008).

Čeprav smo večino dela posvetili raziskavam rotavirusov smo opravili podobne raziskovalne pristope tudi na modelnem virusu PePMV - virusu mozaika pepina in ToMV - virusu mozaika tobaka z izredno dobrimi rezultati.

Poleg navezave na COST akcijo smo projekt navezali tudi na evropski projekt BIOTRACER v sodelovanju z Biotehniško fakulteto, UL. V okviru tega projekta smo opravili preliminarne raziskave za Hepatitis A (HAV) in mačje kaliciviruse (FCV) in dobili zelo obetajoče rezultate.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvo, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta za naročnike in glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Tekom projekta smo razvili izredno učinkovito diagnostično metodo za rotavirus, ki so povzročitelji bolezni prebavil pri človeku in živalih, ki vsako leto zahtevajo več smrtnih žrtev po svetu, še posebno pri otrocih. Okužbe pitnih voda lahko predstavljajo močan vir okužbe za različne populacije civilistov, zlasti v primeru naravnih nesreč kot so poplave ali namenska okužba, ki lahko v času vojnega stanja onemogoči vojake. Metoda temelji na koncentriranju virusov s CIM diski in nadaljnjo detekcijo s PCR v realnem času. Dokazali smo možnost uporabe razvite metode iz okoljskih voda na terenu in njihovo učinkovitost v zasledovanju virusov v pitnih vodah v času poplave v letu 2007. Metodo smo diseminirali tako, da je na voljo v treh diagnostičnih centrih v Sloveniji (dveh v Ljubljani in enem v Mariboru). Zaradi visoke kvalitete razvite metode, so metodo povzeli tudi tuji laboratoriji kot so diagnostični laboratorij Veterinarske fakultete, Univerze v Helsinkih, ki z našo metodo študira prisotnost rotavirusov v vodah v povezavi z epidemijo gastroenteritisa kot posledice virusov v vodah, ki se je zgodila na Finskem. Efektivno koncentriranje in določanje rotavirusov na terenu služi kot dokaz delovanja koncepta na podlagi katerega je možno izdelati prototip naprave za terensko diagnostiko za potrebe civilnega prebivalstva in vojske, še zlasti na oddaljenih lokacijah. Rezultati so bili pojasnjeni specialistom Uprave za zaščito in reševanje RS, ki lahko razvito znanje takoj uporabijo v primeru potrebe. Metoda omogoča mnogo boljše epidemiološke študije ob epidemijah gastroenteričnih virusov.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta za naročnike in glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Razvita metoda ima tako velik pomen za razvoj temeljnih znanj o epidemiologiji pomembnih humanih virusov, tako v Sloveniji kakor tudi v mednarodnem okolju. Rezultati so pomembni tudi za razvoj novih tehnologij, za zdravstveno varstvo kakor tudi za varovanje okolja pred biotskimi agensi. Dokaz koncepta metode, ki smo ga podali v projektu je bil preliminarno že preizkušen na drugih pomembnih humanih virusih, ki se lahko nahajajo in prenašajo z vodo. Tako lahko v nadaljevanju raziskave vodijo v razvoj metode, ki bo zaznavala veliko število virusov hkrati in zaobjela vse pomembnejše humane viruse v vodah. Možen je razvoj prenosne naprave, ki se zlahka komercializira, zaradi njene uporabe v primeru naravnih nesreč ali v vojaške namene, pri kontroli pitne vode vojaških enot na terenu.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

-Kot že omenjeno uporabljajo razvito tehnologijo trije laboratoriji v Sloveniji ter laboratorij na Finskem na Finski Univerzi, (skupina Leena Maunula).
-Na podlagi uspešnih raziskav smo bili povabljeni v COST akcijo 929, ki se osredotoča na koncentriranje in detekcijo humanih virusov v hrani in vodi.

-Na podlagi rezultatov smo bili povabljeni k sodelovanju v evropskem projektu BIOTRACER za koncentriranje in detekcijo Hepatitis A in mačjega kalicivirusa.
-Dobili smo že nove pobude za sodelovanje v evropskem projektu s strani SASA, Škotske raziskovalne ustanove za razvoj metod za koncentriranje virusov, dogovori so v teku.

3.7. Število diplomantov, magistrstov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

Nacionalni Inštitut za Biologijo: 1 magistrsko delo (Natasa Mehle), 1 doktorsko delo (Jana Boben)
BIA Separations: 1 doktorsko delo (Petra Kramberger)
Inštitut za Mikrobiologijo in Imunologijo: 1 doktorsko delo (Andrej Steyer)

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO:

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo (NIB) je sodeloval v zadnjih treh letih v več kot 30 mednarodnih projektih. Navajamo tiste, ki so v tesni navezavi s projektom:

Sodelovanje kot partnerji:

1. EU projekt 6. okvirni program »Portcheck«; Razvoj molekularnih metod detekcije za karantenske povzročitelje bolezni na terenu, Maja Ravnikar, 2004-2007
2. EU projekt 6. okvirni program, »Pepeira«, Pepino Mosaic Virus: epidemiologija, ekonomski vpliv in ocena tveganja nevarnosti škodljivih organizmov, Maja Ravnikar, 2006-2009
3. Mednarodni projekt COST 929 Evropska mreža na področju virologije hrane in okoljevarstva, (ENVIRONET), Ion Gutierrez, 2007-2010
4. Bilateralni projekt SLO-GB, PSP 15/2006 Razvoj polimerazne verižne reakcije v realnem času z a določanje različkov krompirjevega virusa Y, Maja Ravnikar, 2006
5. Bilateralni projekt PSP 11/2005, SLO GB VSL, Detekcija genov vpletenih v obrambni odziv krompirja na virusno okužbo, Maja Kovač, 2005

Sodelovanje preko partnerja Biotehniške fakultete, UL:

6. EU projekt 6. okvirni program »BIOTRACER«; Improved bio-traceability of unintended micro-organisms and their substances in food and feed chains« Peter Raspor (BF), 2007-2010.

BIA SEPARATIONS:

1. Influenza virus purification platform. Collaboration with AVIR green Biotechnologies (Austria) on the production and purification of attenuated influenza virus to be used as vaccines.

INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMMUNOLOGIJO:

1. DIVINE -NET Prevention of emerging (food borne) enteric viral infections. Health and Consumer protection DG. No. 790965 (dr. M Poljšak Prijatelj).
2. Rotavirus Surveillance in Europe: Determining the Diversity of Co-circulating Rotavirus strains in Consecutive Rotavirus Seasons. Health Protection Agency, London, UK (dr. M Poljšak Prijatelj).
3. EVENT - Providing tools to prevent emergence of enteric viruses FP6 IP STREP (Contract No. 502571) (dr. Poljšak Prijatelj).

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Intenzivno mednarodno sodelovanje v zgoraj opisanih projektih je najboljši način, da lahko pri svojih raziskavah uporabimo zadnje izsledke raziskav, ki so na svetu na voljo in hkrati seznanimo znanstveno sfero s svojimi rezultati. Če omenimo nekaj primerov:

-zaradi vpletenosti v COST 929 evropski projekt smo lahko dobili še neobjavljene podatke o stanju referenčnih metod za koncentriranje in detekcijo virusov v hrani in vodah. Na ta način smo lahko optimizirali raziskovalne metode in nadgradili obstoječe znanje. Hkrati pa smo imeli priložnost v predavanjih na simpoziju v Italiji v letu 2008, predstaviti in prediskutirati lastne rezultate. Podobne izkušnje imamo pri projektu BIOTRACER. V tej sodelavi smo uspeli pripravljene tehnologije preizkusiti na dodatnih virusih. Preliminarne raziskave, ki vključujejo virusa Mačji kalicivirus in Hepatitis A virus so izjemno obetavne.

-V okviru evropskega projekta Pepeira smo uporabili za določanje virusa PepMV tehnologijo PCR v realnem času, ki jo bomo vključili v medlaboratorijski test, kar bo omogočilo uporabe detekcijske metode, ki smo jo razvili skupaj s partnerjem iz Velike Britanije v diagnostičnem protokolu, ki bo pripravljen za EPPO (Evrosko organizacijo za varstvo rastlin) kot uradni detekcijski protokol.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani: <http://www.izum.si/>

M1-0145: »Razvoj metod za določanje virusov v pitnih vodah v primeru terorističnega napada in naravnih nesreč«

Vodja projekta: dr. Kristina Gruden

V tem projektu smo razvili hitre prenosne diagnostične metode za različne patogene viruse, ki jih lahko najdemo v vodi in povzročajo bolezni pri ljudeh in rastlinah. Metode so uporabne za določanje prisotnosti virusov v humanih vzorcih in v vzorcih pitnih voda, kar je še posebno pomembno v primeru suma okužbe pitne vode s fekalijami, do katerega pride pri naraslih vodah, še posebno v primeru naravnih nesreč kot so neurja, poplave in potresi ter v primeru vojnega stanja. Metode bodo uporabne v mirodobnem obdobju za monitoring okoljskih voda, tako pitnih kakor tudi voda, ki se uporabljajo kot namakalne vode, kjer virusi lahko prehajajo na kmetijske pridelke ter v vzorcih vod iz kopališč. Metode, ki jih smo razvili so osnovane na tehnologiji PCR v realnem času in koncentriranju virusov s CIM kromatografskimi nosilci. So izjemno specifične in občutljive, saj zaznavajo rotaviruse v izredno nizkih koncentracijah (do 10 virusnih molekul na reakcijo), kar z dosedanjimi znanimi metodami brez predhodnih zapletenih in dolgotrajnih načinov koncentriranja vzorcev ni bilo mogoče. CIM monolitne kromatografske nosilce so razvili in proizvedli v podjetju projektnega partnerja BIA Separations v Sloveniji, kar je še posebno pomembno v vojnih razmerah. Ker je metodologija nova, smo izsledke predstavili v znanstveni literaturi in na predavanjih na mednarodnih znanstvenih srečanjih. Izvedli smo testiranje na mestu vzorčenja z uporabo prenosne opreme in pripravili delavnico, kjer smo praktično prikazali testiranje vzorcev z razvito metodologijo in navodila za vzorčenje za zainteresirane uporabnike civilne zaščite in slovenske vojske. Delo je bilo opravljeno v sodelovanju projektih partnerjev Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB), Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, MF (IMI), podjetjem BIA Separations (BIA) in Zavodom za Zdravstveno Varstvo Maribor (ZZV). Razvita metodologija se že uporablja v Slovenskih diagnostičnih laboratorijih ter v laboratorijih na Finskem.

M1-0145: »Development of methods for the detection of virus in potable drinking waters in case of terrorist attack and natural disaster«

Project manager: dr. Kristina Gruden

In this project we have developed rapid diagnostic methods for different pathogenic viruses that can be found in water and can provoke disease both in humans and plants. The methods can be applied to the detection of such viruses in human stool samples and in drinking waters. This is especially important when the drinking water is suspected to be contaminated with fecal waters, what typically occurs after natural disasters, such as, huge rainfalls, floods or earthquakes, and in case of war status. At the same time, the methods will be useful during peace status for monitoring recreational waters and environmental waters, especially those ones used as irrigation waters, through which viruses can be transferred to agricultural products. The methods we have used are based on the technology of real time PCR and virus concentration using CIM chromatographic supports. They ensure the highest specificity and sensitivity for the detection of such low virus concentrations (down to 10 virus molecules per reaction), that classic methods are unable to detect unless applying tedious and long lasting pre-concentration techniques. CIM monolithic chromatographic support are developed and produced in Slovenia by the project partner BIA separations, what can be especially important in a potential war situation. Due to the innovative character of the methodology, the obtained results have been presented and published in the scientific literature. We performed on-site detection tests, with the use of portable equipment and prepared a workshop, where we practically demonstrated the sampling procedure and testing of samples with the developed methodology to potentially interested representatives from civil protection bodies and Slovenian army. The research done was a consequence of the collaboration of all project partners, National Institute of Biology (NIB), Institute for Microbiology and Immunology (IMI), the company BIA separations (BIA), and the Unit for health protection from Maribor (ZZV). The developed methodology is already being used in Slovenian diagnostic laboratories and in a laboratory in Finland.

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

2006:

- Tečaj PCR v realnem času v delavnici, ki je potekala od 17 – 20 julija (NIB).
- 8.6.2006 so bili na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) predstavniki iz Ministrstva za obrambo, Uprave za zaščito in reševanje in Slovenske vojske. Prisotno je bilo vodstvo NIB ter vodje projektov. Predstavljeni so bili projekti ter dejavnost Nacionalnega inštituta za biologijo, potekala je tudi razprava o možnostih tesnejšega sodelovanja.
- 16.10.2006 je potekal tudi sestanek na Upravi RS za zaščito in reševanje, kjer so bile predstavljene g. Milici Slokar in vsebinskim spremljevalcev ter nekaterim ostalim sodelavcem tekoče dejavnosti na projektu.
- 23.10.2006 sta se predstavnici ga. Milica Slokar in ga. Irma Loriger iz Uprave za zaščito in reševanje (URSZR) MORS pridružili sestanku na NIB, na katerem smo jih seznanili s stanjem projekta. Dogovorili smo se za sestanek na začetku leta 2007 na katerem bi predstavili polletne rezultate.
- Delavnica o čiščenju virusov, ki je potekala od 13-17 novembra (NIB).

2007:

- Marca 2007 so bili na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) predstavniki iz Ministrstva za obrambo, Uprave za zaščito in reševanje, Slovenske vojske, vključno s vsebinskimi spremljevalci projektov. Prisotno je bilo vodstvo NIB ter vodje projektov. Predstavljeni in prediskutirani so bili poteki projektov.
- Leta 2007 smo na NIB izvedli dve enotedenski delavnici za potrebe projekta in projektne skupine na katerih so sodelovali raziskovalci več partnerjev: Teoretični in praktični tečaj PCR v realnem času. 15-17 Maj in 5-7 November.
- Maja Ravnikar je predstavila delo na virusih splošni javnosti v dveh TV oddajah: Virusi, naši vsakdanji spremljevalci. 2007; Ljubljana: TV Slovenija. [COBISS.SI-ID 23374553] in X v znanosti : [predvajano na prvem programu RTV Slovenija, 04. decembra 2007 ob 21:00]. Arhivski avtorski izvod. Ljubljana: RTV Slovenija, 2007. 1 el. optični disk (DVD), 52 min. Windows/DVD player. [COBISS.SI-ID 1816911].

2008

- Januar 2008 smo se enkrat rezultate projekta predstavili predstavnikom Uprave RS za zaščito in reševanje, Ministrstva za obrambo RS ter Slovenske vojske v okviru predstavitve CRP- MIR projektov na NIB, ki so tako lahko sprotno sousmerjali delo na projektu.
- April 2008, je potekala na NIB dvodnevna delavnica o dolocanju in kvantifikaciji rotavirusov s qPCR, eno korakni in dvo korakni, ter o izolaciji virusni RNA s različnimi metodami. Prisotni so bili raziskovalci iz NIB, BIA separations in ZZV Maribor.
- Septembra 2008, je potekala praktična delavnica kjer smo, na terenu, pokazali proceduro dolocanja rotavirusov na terenu s uporabo CIM in prenosnik qPCR system. Prisotni so bili vsebinski spremljevalec projekta ter dve prestavniki Uprave za Zaščito in Reševanje.
- Organizirali smo tudi tretji kongres mednarodne delovne skupine s področja rastlinskih virusov (IWGLVV), ki je potekal od 20. do 23. avgusta 2008 v Ljubljani. Rezultati projekta so bili obširno predstavljeni v obliki predavanja in posterjev. Udeležilo se ga je preko 70 znanstvenikov iz vsega sveta. V okviru kongresa smo organizirali tudi delavnico na temo virusne diagnostike, ki se ga je udeležilo večje število firosanitarnih inšpektorjev.

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije. Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.