



**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU**  
**WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ**  
**KATEDRA PATOLOGII**  
**ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

**mgr PAULINA JANICKA**

**OPRACOWANIE ZESTAWU DIAGNOSTYCZNEGO DO DETEKCJI**  
**NOROWIRUSÓW W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH I ŚRODOWISKOWYCH.**  
**CZĘSTOTLIWOŚĆ WYSTĘPOWANIA**  
**I ZNACZENIE EPIDEMIOLOGICZNE NOROWIRUSÓW**

**PROMOTOR: dr hab. BARBARA BAŻANÓW, prof. UPWr**  
**OPIEKUN POMOCNICZY: dr KATARZYNA PAŁA**

**WROCŁAW 2024**

## Spis treści

1. WYKAZ SKRÓTÓW.....	6
2. WSTĘP.....	8
2.1. Przypadki infekcji wywołanej norowirusami.....	9
2.2. Przyczyny infekcji norowirusowych.....	11
2.3. Straty ekonomiczne.....	13
2.4. Patogeneza zakażeń norowirusowych.....	13
2.5. Morfologia norowirusów.....	13
2.6. Historia badań nad norowirusami.....	14
2.7. Testy do wykrywania norowirusów.....	15
2.8. Stres oksydacyjny.....	16
3. CELE BADAWCZE DOKTORATU.....	18
4. MATERIAŁ I METODY.....	19
4.1. Zezwolenia i oświadczenia etyczne.....	19
4.2. Obiekt badań.....	19
4.3. Projekt badania.....	20
4.4. Analiza markerów antyoksydacyjnych, całkowitej pojemności antyoksydacyjnej i markerów peroksydacji lipidów.....	21
4.4.1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (EC 1.15.1.1).....	21
4.4.2. Aktywność katalazy (CAT) (EC 1.11.1.6).....	21
4.4.3. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) (EC 1.8.1.7).....	21
4.4.4. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) ((EC 1.11.1.9).....	21
4.4.5. Aktywność S- transferazy glutationowej (GST) (EC 2.5.1.18).....	22
4.4.6. Poziom całkowitej pojemność antyoksydacyjnej (TAC).....	22
4.4.7. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA).....	22
4.5. Opracowanie prototypu sprzętu diagnostycznego w postaci szybkich testów antygenowych do detekcji norowirusów. Testy do powszechnego użytku.....	22
4.5.1. Prototyp czujnika szybkiego wykrywania norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych.....	24
4.5.1.1. Przygotowanie testu.....	24
4.5.1.2. Przygotowanie próbek kontroli pozytywnej i negatywnej do walidacji testu.....	24
4.5.1.3. Procedura pomiarowa.....	25
4.5.2. RT-qPCR.....	25
4.6. Przygotowanie wyciągów roślinnych i surowców pochodzenia naturalnego do oceny zdolności wirusobójczych i przeciwutleniających ekstraktów roślinnych.....	26
4.7. Analiza statystyczna.....	27
4.7.1. Analiza statystyczna parametrów antyoksydacyjnych.....	27
4.7.2. Analiza statystyczna ekstraktów wyciągów roślinnych o działaniu przeciwwirusowym.....	27
5. WYNIKI.....	28

5.1. Analiza histopatologiczna .....	28
5.2. Analiza parametrów antyoksydacyjnych .....	33
5.3. Opracowanie prototypu sprzętu diagnostycznego w postaci szybkich testów antygenowych do detekcji norowirusów. Testy do powszechnego użytku .....	37
5.3.1. Testy funkcjonalne prototypu biosensora do wykrywania norowirusów .....	40
5.3.1.1. Badanie liniowości i limitu detekcji, ocena selektywności .....	40
5.3.1.2. Badania stabilności biosensora do wykrywania norowirusów .....	42
5.3.1.3. Porównanie wyników analiz genetycznych z pomiarami uzyskanymi z prototypu biosensora do wykrywania norowirusów .....	43
5.3.2. Prototyp czujnika szybkiego wykrywania norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych: Jednorazowy czujnik - test .....	44
5.3.2.1. Wyniki RT-qPCR .....	44
5.3.2.2. Pomiary kontroli pozytywnej i negatywnej na elektrodzie .....	44
5.3.2.3. Czulość i swoistość zwalidowanego testu .....	46
5.4. Wyniki działania przeciwwirusowego ekstraktów roślinnych parzonych na zimno i stężonych na zimno przeciwko norowirusowi mysiemu (MNV) .....	46
6. DYSKUSJA .....	49
7. WNIOSKI .....	59
8. STRESZCZENIE .....	61
9. SUMMARY .....	63
10. BIBLIOGRAFIA .....	65
11. LISTA TABEL .....	83
12. LISTA RYCIN .....	84
13. ZAŁĄCZNIKI .....	85
13.1. Publikacja 1 .....	85
13.2. Publikacja 2 .....	98
14. SUPLEMENT .....	111
14.1. Opis inkubacji testu szybkiego wykrywania norowirusów .....	111
14.2. Prototyp testu szybkiego wykrywania norowirusów .....	112
14.2.1. Jednorazowy czujnik – test .....	112
14.2.2. Urządzenie pomiarowe Aquanostic Reader .....	113
14.2.3. Zasady działania testu .....	114
14.2.4. Proces inkubacji prototypu testu szybkiego wykrywania norowirusów .....	116
14.2.5. Walidacja testu szybkiego wykrywania norowirusów .....	119
14.2.6. Bibliografia suplementu .....	148

## **PODZIĘKOWNIA**

Mojej promotorce, Pani Profesor UPWr dr hab. Barbarze Bażanów, składam serdeczne podziękowania za niezmierną cierpliwość, życzliwość, wszechstronną pomoc w trakcie trwania doktoratu.

Wyrazy wdzięczności składam również wszystkim Pracownikom Zakładu Mikrobiologii, w szczególności Pani mgr Aleksandrze Pogorzelskiej, za okazaną pomoc i życzliwość.

Najbliższym dziękuję za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.

**Część wyników zamieszczonych w dysertacji została opublikowana w formie oryginalnych prac twórczych:**

1. Janicka, P.; Stygar, D.; Chełmecka, E.; Kuropka, P.; Miązek, A.; Studzińska, A.; Pogorzelska, A.; Pala, K.; Bażanów, B.

*Oxidative stress markers and histopathological changes in selected organs of mice infected with murine norovirus 1 (MNV-1)*

Int. J. Mol. Sci. 2024, 25 (7): 3614. <https://doi.org/10.3390/ijms25073614>

2. Janicka, P.; Baluta, S.; Winiarski, J.; Halicka-Stępień, K.; Pogorzelska, A.; Cabaj, J.; Pala, K.; Bażanów, B.

*Sensitive electrochemical gold nanoparticle-based immunosensor for norovirus detection in food samples*

RSC Adv. 2024, 14 (9): 6028-6040. <https://doi.org/10.1039/D3RA08586D>

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW

ADC – przetwornik analogowo-cyfrowy (analog-to-digital converter)

AuE – złota elektroda

BSA – surowica bydlęca (bovine serum albumin)

CAT – katalaza (catalase)

CDC – Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention)

CE – elektroda zliczająca (counter electrode)

CFU – jednostka określająca liczbę mikroorganizmów lub komórek w materiale badanym (colony forming unit)

CV – woltamperometria cykliczna (cyclic voltammetry)

DAC – przetwornik cyfrowo-analogowy (digital-to-analog converter)

DI – woda dejonizowana (deionized water)

DPV – różnicowa woltamperometria pulsowa (differential pulse voltammetry)

DSP – cyfrowe przetwarzanie sygnałów (digital signal processing)

EDC – chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu

EIS – elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (electrochemical impedance spectroscopy)

ELISA – test immunoenzymatyczny (enzyme-linked immunosorbent assay)

GI-GX – genogrupy I-X

GPx – peroksydaza glutationowa (glutathione peroxidase)

GR – reduktaza glutationowa (glutathione reductase)

GST – S-transferaza glutationowa (glutathione s-transferase)

HDMI – multimedialny interfejs wysokiej rozdzielczości (high-definition multimedia interface)

HuNoV – ludzkie szczepy norowirusa (human norovirus)

IC – immunochromatografia

kb – kilobajt

LAMP – amplifikacja izotermiczna za pośrednictwem pętli (loop-mediated isothermal amplification)

MDA –dialdehyd malonowy (malondialdehyde)

MnSOD – manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (manganese superoxide dismutase)

MNV– mysi norowirus (murine norovirus)

NHC – ester -N-hydroksysukcynoimidowy

nm – nanometr

NoV – norowirus

ORF – otwarta ramka odczytu (open reading frame)

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanami (phosphate buffered saline)

RAW – linia komórkowa mysich makrofagów

RE – elektroda odniesienia (reference electrode)

RT-PCR –reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (reverse-transcription polymerase chain reaction)

RT-qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

SAM – monowarstwa samoorganizująca się

SEM – skaningowy mikroskop elektronowy (scanning electron microscope)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dismutase)

TAC – całkowita pojemność antyoksydacyjna (total antioxidative capacity)

TCID<sub>50</sub> – dawka zakaźna dla 50% komórek hodowli tkankowej (tissue culture infectious dose 50)

TOS – całkowity status oksydacyjny (total oxidative status)

TPC – całkowita zawartość związków fenolowych (total phenolic content)

WB – metoda Western Blot stosowana w biologii molekularnej

WE<sub>n</sub>– elektroda pracująca (working electrode)

## 2. WSTĘP

Norowirusy (NoVs) stanowią jeden z głównych czynników etiologicznych zapalenia żołądka i jelit wśród dorosłych i dzieci na świecie [1]. Szacuje się, że globalnie, co roku, wirusy te powodują 685 milionów zachorowań oraz 210 000 zgonów [1, 2]. Straty ekonomiczne spowodowane infekcjami tym wirusem sięgają w Stanach Zjednoczonych 4,2 miliarda USD, a straty społeczno-gospodarcze tego kraju wynoszą 60,3 miliarda USD rocznie [3]. Szacuje się, że dzieci przed ukończeniem drugiego roku życia przechodzą co najmniej jedną infekcję wywołaną tymi patogenami [1, 4]. Wielu chorych nie wykazuje objawów klinicznych, jednak wydalą wirusa drogą fekalną. W badaniach przeprowadzonych wśród dzieci bez objawów klinicznych, odsetek siewców z kałem sięgał od ok. 11% do prawie 50%, w zależności od badanej grupy i kraju [5-10].

Ogniska infekcji norowirusem notowane są głównie w miejscach o dużym zagęszczeniu dzieci i osób dorosłych, takich jak żłobki, przedszkola, szkoły, sale zabaw, domy starości, szpitale, bazy wojskowe czy statki wycieczkowe [11]. Szczepy NoVs chorobotwórcze dla ludzi (HuNoV) są transmitowane głównie drogą oralno-fekalną poprzez zanieczyszczoną kałem lub wymiocinami żywność, wodę oraz powierzchnie [4, 12-14]. Kontaminacja żywności może wystąpić na różnych etapach produkcji, począwszy od przetwarzania produktu, do przygotowania dania docelowego [15]. Najczęściej źródłem zakażenia są produkty świeże i nietrwałe np.: owoce morza (ostrygi, krewetki), jak owoce i warzywa, takie jak winogrona, truskawki, maliny, borówki czy sałata rzymska [16-19].

Objawy zakażenia HuNoVs u ludzi obejmują zazwyczaj biegunkę, wymioty, nudności, bóle brzucha, gorączkę, apatię i odwodnienie, utratę apetytu, rzadziej pojawiają się dreszcze [20, 21]. Infekcje mogą być związane również z stanami neurologicznymi, takimi jak ostre zapalenie mózgu, które może skutkować encefalopatią, dezorientacją, bólami głowy, a w niektórych przypadkach, nawet drgawkami [22]. Objawy najczęściej ustępują po 72 godzinach, w ciężkich przypadkach mogą jednak prowadzić do skrajnego odwodnienia, którego konsekwencją może być zgon pacjenta [23].

Jak dotąd opracowano jedynie leczenie objawowe, niemniej jednak istnieją naturalne środki roślinne, takie jak kwiatostan ketmii szczawiowej (*Hibiscus sabdariffa* L.), nasiona pieprzowca uzbrojonego (*Zanthoxylum armatum* DC.), liście linderii trójklapowej (*Lindera obtusiloba* Siebold & Zucc.) [24] czy nasiona czarnej maliny (*Rubus coreanus* Miq.), wykazujące właściwości przeciwnorowirusowe [25].



## 2.1. Przypadki infekcji wywołanej norowirusami

Jak wynika z systematycznego przeglądu literatury przeprowadzonego w 2008 przez Patela i wsp. [26], norowirusy są odpowiedzialne za znaczną liczbę przypadków biegunek wymagających hospitalizacji i wizyt klinicznych, a także za zgony wśród małych dzieci. Szacuje się, że każdego roku w krajach rozwiniętych, z powodu biegunki wywołanej patogenem, dochodzi do około 64 000 hospitalizacji i 900 000 wizyt w klinikach wśród osób nieletnich. W krajach rozwijających się, szacunkowo 200 000 zgonów wśród osób poniżej piątego roku życia przypisuje się temu czynnikowi zakaźnemu [26].

Zakażenia HuNoVs wywoływane są przez grupy genetyczne GII (głównie GII.4), GI oraz, w bardzo ograniczonym stopniu, GIV [27-29]. Ponadto u około 22% ludzi wykryto przeciwciała przeciwko grupie genetycznej GIII (bydłęcy NoV), a u 22,6% lekarzy weterynarii zajmujących się małymi zwierzętami, wykryto wirusy należące do GVI (NoV patogenny dla psów) [29]. W badaniach serologicznych w kierunku bydłowego norowirusa, przeprowadzonych przez Widdowson i wsp. w Holandii [30], przeciwciała wykryto u 840 osób, w tym u 210 lekarzy weterynarii. Z kolei wśród fińskich dzieci monitorowanych w ramach badań nad szczepionką przeciwko rotawirusom, kaliciwirusy (norowirusy, sapporowirusy) zostały wyizolowane u 20% członków grupy placebo (bez podaży szczepionki) oraz u 22% zaszczepionych pacjentów [31]. Badania przeprowadzone w Tajlandii [32], Malawi [33], Chile [34] i Indiach [35] potwierdziły, że patogen jest jedną z najczęstszych przyczyn zapalenia żołądka i jelit lub jest wymieniany jako drugi w kolejności po rotawirusach. Co więcej, pięcioletnie obserwacje przeprowadzone w Melbourne (Australia) przez Kirkwood i wsp. wykazały, że wśród dzieci poniżej piątego roku życia częstość zakażenia ludzkim kaliciwirusem wynosiła 9,2% (113/1233). Aż 95% tych przypadków spowodowanych było zakażeniami NoVs, za pozostałe 5% odpowiadały sapporowirusy [36].

U dzieci często występują bezobjawowe infekcje wirusem. Tego typu zakażenia, połączone z wydalaniem patogenu z kałem, opisano w badaniach przeprowadzonych w Ameryce Środkowej w Leon (Nikaragua), w których 19 ze 163 (11,7%) małych dzieci okazało się siewcami wirusa [5]. Z kolei w okolicach miasta Meksyk (Meksyk), NoV wykryto w próbkach kału u 31 z 63 (49,2%) nieletnich [6]. W środkowej Brazylii w ciągu dwóch lat, u 37,5% dzieci w wieku przedszkolnym odnotowano co najmniej jeden epizod bezobjawowej infekcji norowirusem [7]. W badaniach przeprowadzonych w Burkina Faso

(Afryka Zachodnia), patogen był wykrywany w próbkach kału młodszych pacjentów zarówno bezobjawowych, jak i wykazujących objawy [37]. Podobne badania prowadzono również w krajach europejskich [8]. We Francji, u dzieci z różnymi dziedzicznymi niedoborami odporności, bezobjawowe infekcje obserwowano u około 11,6% [37]. W Wielkiej Brytanii, do projektu włączono 2205 osób. U tych pacjentów subkliniczna infekcja norowirusowa rozwinęła się w 361 przypadkach, a najwyższy odsetek zachorowań występował u dzieci poniżej piątego roku życia [10]. Zakażenia występujące podczas epidemii wywołanych szczepami GII.4 mogą prowadzić do poważnych konsekwencji oraz śmierci [39]. Ponadto, zaawansowany wiek pacjenta stanowi dodatkowy, istotny czynnik ryzyka zgonu [40].

W badaniach Esposito i wsp. [41], przeprowadzonych we Włoszech w okresie od września 2012 do września 2013, NoV GII.4 został wykryty w 3 z 562 (0,5%) próbek pobranych z nosogardzieli hospitalizowanych dzieci i nastolatków, wykazujących objawy grypopodobne. U każdego z tych pacjentów, przed infekcją oddechową, wystąpiły typowe objawy zakażenia norowirusem [41]. Patogen ten został wykryty również w aspiratach z tchawicy dwóch wcześniaków z infekcją jelitową NoV [42].

Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), Stany Zjednoczone Ameryki Północnej) szacuje, że co roku NoV jest odpowiedzialny za 21 milionów (60%) przypadków ostrego zapalenia żołądka i jelit w Stanach Zjednoczonych [43]. Systematyczny przegląd wszystkich raportów dotyczących NoV wykazał, że od 5% do 31% przypadków zapalenia żołądka i jelit u pacjentów hospitalizowanych oraz 5% do 36% przypadków zgłoszonych w ambulatorium jest spowodowanych infekcją tym wirusem, wykrytym metodą reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR). CDC ocenia również, że w Stanach Zjednoczonych, co roku NoV jest przyczyną 400 000 wizyt na oddziałach ratunkowych i 71 000 hospitalizacji. Niemniej jednak nie wszystkie przypadki zostają zgłoszone w odpowiednich instytucjach [44].

NoV jest odpowiedzialny za zakażenia na oddziałach szpitalnych oraz w domach opieki [45]. Epidemie w zamkniętych przestrzeniach mogą stanowić wyzwanie logistyczne, zarówno pod względem wyeliminowania źródła infekcji, jak i finansowego obciążenia dla placówek służby zdrowia [46].

## 2.2. Przyczyny infekcji norowirusowych

Na zakażenia norowirusami podatni są ludzie we wszystkich grupach wiekowych, ale wyższe wskaźniki zarówno zachorowalności, jak i umieralności obserwuje się w grupie dzieci i osób starszych. Droga fekalno-oralna odpowiada za główną transmisję patogenu, chociaż opisano również kilka innych dróg zakażenia, takich jak droga kropelkowa [47, 48], pokarmowa poprzez żywność, wodę i kontaminację środowiska [15].

Kaplan i wsp. jako pierwsi opisali infekcję NoV wywołaną zanieczyszczoną wodą. Wybuch zakażeń miał miejsce w Gruzji w 1982 roku, a epidemia dotknęła około 1500 osób, co potwierdzono w badaniach serologicznych [45]. W późniejszych epidemiach ogniska zakażeń wiązano z różnymi źródłami wody: miejskiej, pitnej, a także z wykorzystywaną do celów rekreacyjnych, takich jak rafting i pływanie [13, 49-54]. Choć przypuszcza się, że większość zanieczyszczeń wody związana jest z odprowadzaniem ścieków do rzek, strumieni i innych zbiorników wodnych, naturalne występowanie patogenu w systemach wodnych nie zostało w pełni zbadane i potwierdzone. Istnieje wiele trudności, wynikających głównie z powodu ograniczeń w testowaniu różnych źródeł środowiskowych, związanych z charakterystyką rozprzestrzeniania się wirusa w środowisku. Małże, szczególnie ostrygi, ale również inne skorupiaki, często pełnią istotną rolę w transmisji zanieczyszczeń wody w środowisku oraz wywoływaniu epidemii związanych z żywnością, z uwagi na możliwość przenoszenia wirusów i mikroorganizmów chorobotwórczych [55]. Pomimo oczyszczania ścieków udokumentowano w nich obecność norowirusa, a jego najwyższe stężenia odnotowywano w miesiącach jesienno-zimowych. Istnieje kilka różnych metod eliminacji NoV z wody, takich jak użycie basenów do stabilizacji ścieków, stosowanie osadu czynnego, wykorzystanie bioreaktorów membranowych lub substancji chemicznych [56-59]. Mimo stosowania wyżej wymienionych metod dochodzi do epidemii, a w kilku przypadkach ich przyczyna związana była z niewystarczającym chlorowaniem wody [59].

Transmisja NoV z żywnością może odbywać się na dwa sposoby: poprzez skażenie surowca w miejscu zbiorów (takich jak: pola uprawne, stanowiska połowu owoców morza) oraz podczas jego bezpośredniej obróbki przed podaniem. Analiza kilkuset zgłoszonych przypadków infekcji norowirusowych wykazała, że najwięcej (54%) zachorowań wiąże się z zanieczyszczeniem wirusem miejsc zbiorów (362/666), natomiast epidemie, których źródłem były placówki gastronomiczne, stanowiły 35% (294/830). W latach 1991–2000

liczba zgłoszonych w USA ognisk, związanych z chorobami przenoszonymi przez żywność ulegała wahaniom. Najmniejszą (411) ilość przypadków odnotowano w 1992, podczas gdy największą (1414) w roku 2000. W 1998 r. w USA, według CDC, około 18% wszystkich ognisk chorób związanych z ostrą biegunką spowodowanych było norowirusami. W ramach badań przesiewowych w kierunku NoV, przeprowadzonych w latach 1998 - 2000 również w Stanach Zjednoczonych, przetestowano 4072 osoby wykazujące objawy infekcji gastroenterologicznych. Szczegółowo udokumentowano 1216 przypadków, z czego 136 zidentyfikowano jako związane z norowirusem, 173 z podłożem bakteryjnym, a u pozostałych 907 pacjentów nie określono przyczyny [15,60].

Owoce, warzywa i skorupiaki, a także kanapki, sałatki czy inne posiłki zawierające tego typu składniki, mogą stanowić źródło NoV, ponieważ często spożywane są na surowo lub bez obróbki termicznej, co zwiększa ryzyko infekcji [16, 18, 61-67]. Potwierdzają to badania Hall i wsp. [67], w których surowa żywność stanowiła źródło infekcji w 56% z analizowanych 76 ognisk wywołanych przez norowirusa, w porównaniu z 19% przypadków z 124 ognisk bakteryjnych i 28% z 408 ognisk o nieznannej etiologii [67]. W przypadku dań mięsnych, których konsumpcja skutkowała ostrą biegunką, NoV wykrywano znacznie rzadziej (11% przypadków) niż bakterie (44%). Odsetek zakażeń o nieznannej etiologii był w tego typu infekcjach również znacznie wyższy (34%). W przypadku zakażeń wśród pracowników zajmujących się handlem żywnością, częściej dochodziło do infekcji norowirusowych (48%), niż bakteryjnych (20%) lub zakażeń o nieustalonej przyczynie [61]. Zanieczyszczenie żywności wirusem wiąże się najczęściej z brakiem higieny podczas przygotowywania posiłków i kontaktem osób chorych z pokarmem [68].

Udokumentowane ogniska NoV w restauracjach, stołówkach oraz wśród konsumentów produktów firm cateringowych wykazały, że ich wielkość wahała się od kilku pojedynczych przypadków do dużych epidemii [69]. Przykładowo na terenie USA w 2000, wirus został wykryty u 32 z 59 sprzedawców sieci salonów samochodowych, pochodzących z ośmiu stanów. Infekcje te były spowodowane spożyciem sałatek serwowanych w trakcie bankietu firmowego. Dodatkowo u dwóch spośród 15 pracowników firmy cateringowej dostarczającej posiłki, odnotowano podwyższone stężenie przeciwciał przeciwko NoV [70].

### **2.3. Straty ekonomiczne**

Na całym świecie epidemie zakażeń norowirusowych wiążą się ze znacznymi obciążeniami finansowymi, obejmującymi koszty opieki zdrowotnej, utratę produktywności i skutki społeczne [71-74]. W samych tylko Stanach Zjednoczonych zakażenia generują rocznie około 5,5 miliarda dolarów kosztów, związanych zarówno z bezpośrednimi wydatkami medycznymi, jak i utratą produktywności [72], w skład których wchodzi straty związane z zakłóceniami w świadczeniu usług, dezynfekcją i procedurami kwarantanny [73, 74]. Dodatkowo epidemie NoV mogą prowadzić do zamknięcia szkół, oddziałów szpitalnych i punktów gastronomicznych, co pogłębia negatywne skutki gospodarcze [75]. Analiza strat ekonomicznych związanych z zakażeniami norowirusem na przestrzeni lat i w różnych krajach wskazuje, że globalnie wirus ten generuje rocznie koszty w wysokości 4,2 miliarda dolarów w bezpośrednich kosztach opieki zdrowotnej i 60,3 miliarda dolarów w kosztach społecznych [76], co ma znaczący wpływ na gospodarkę światową. W Stanach Zjednoczonych NoV jest rocznie przyczyną około 570-800 zgonów; 1,7-1,9 miliona wizyt ambulatoryjnych i 19-21 milionów zachorowań, co przekłada się na istotne straty ekonomiczne [77]. Ponadto kraje posiadające wysokie wpływy do budżetu, ponoszą 62% globalnych kosztów opieki zdrowotnej związanych z patogenem, pomimo że ich wskaźniki zachorowalności są podobne do krajów o niskim i średnim dochodzie [3].

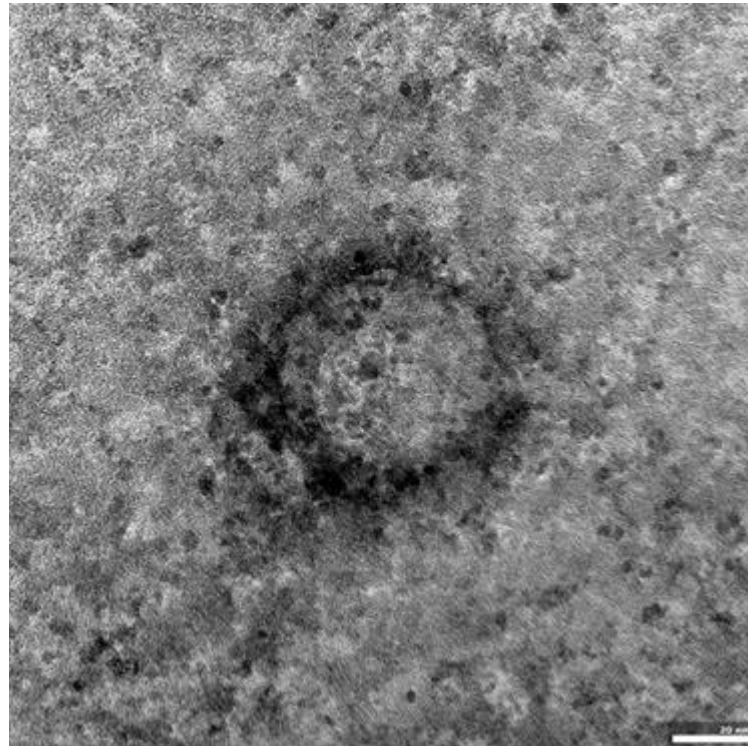
### **2.4. Patogeneza zakażeń norowirusowych**

Patogeneza zakażeń norowirusem jest złożona [67]. Wirus atakuje komórki nabłonka enteroendokrynnego w jelicie cienkim, co wskazuje na jego tropizm do tych komórek [56]. Oprócz tego NoVs replikują się w komórkach dendrytycznych i makrofagach, co może przyczyniać się do rozwoju choroby wskutek dostępu wirusa do podnabłonkowych obszarów jelita [78]. W zakażonych komórkach patogen doprowadza do apoptozy [79]. Ponadto wykazuje zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej, jak również unikania mechanizmów obronnych gospodarza [80].

### **2.5. Morfologia norowirusów**

NoVs należą do rodziny *Caliciviridae* i są sklasyfikowane w 10 genogrupach (GI-GX), które obejmują co najmniej 49 genotypów. Ludzkie szczepy należą do genogrupy I, II i IV, podczas gdy mysie do V. Wirusy te nie posiadają otoczki lipidowej, a ich średnica wynosi około 27 nm. Genom HuNoV składa się z jednoniciowego liniowego, dodatniego

RNA o długości około 7,7 kb i trzech otwartych ramek odczytu (ORF1, ORF2, ORF3), które kodują łącznie 6 białek wirusowych [81].



**Rycina 1.** Mysi norowirus (MNV), transmisyjny mikroskop elektronowy. Zdjęcie mgr Paulina Janicka, Polska Akademia Nauk.

ORF1 koduje poliproteinę, z której następnie powstają białka niestrukturalne, takie jak p48, NTPase, p22, NPg, Pro, Pol. Białka te odgrywają kluczową rolę w replikacji wirusa i patogenezie infekcji wywołanej norowirusem. ORF2 koduje białka tworzące kapsyd wirusa, a jednym z kluczowych białek kodowanych przez ORF2 jest białko VP1. ORF3, zlokalizowana na końcu 3' genomu, koduje białko VP2, które najprawdopodobniej jest odpowiedzialne za przyłączanie się do komórek gospodarza, modulację odpowiedzi immunologicznej, montaż oraz stabilność kapsydu [82]. MNV posiada dodatkową ramkę odczytu, która koduje białko znane jako czynnik wirulencji - VF1 [83].

## **2.6. Historia badań nad norowirusami**

W 1968 w Norwalk (USA) u niemal połowy uczniów szkoły podstawowej odnotowano następujące objawy: nudności (98%), wymioty (92%), ból brzucha (58%) i biegunkę (38%). 32% pacjentów wtórnie zakażyło członków swoich rodzin. Choroba trwała 24 godziny i we wszystkich przypadkach kończyła się całkowitym ustąpieniem objawów. W tamtym czasie nie udało się ustalić przyczyny wybuchu epidemii, jednakże od chorych

osób pobrano wymazy z prostnicy, a materiał ten, po odpowiednim przygotowaniu, podano zdrowym dorosłym mężczyznom w więzieniu Maryland House of Correction w Jessup (Maryland, USA). Badania na ochotnikach dostarczyły dokładnego obrazu objawów infekcji norowirusowej, chociaż czynnik etiologiczny w dalszym ciągu pozostawał nieznany. W 1972 Albert Kapikian wykonał pierwsze zdjęcia obrazu spod mikroskopu elektronowego archiwalnych próbek kału z 1968, co dało podstawy do identyfikacji wirusa, któremu nadano nazwę “wirus Norwalk” [84]. W 2002 r. nazwa “norowirus” została zatwierdzona przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów [85].

W 2002 r. u myszy (RAG)/STAT1 -/- (model myszy z niedoborami odporności) odkryty został mysi norowirus (MNV). Okazało się, że wirus ten efektywnie replikuje się w komórkach mysiej linii komórkowej makrofagów RAW264.7 [84]. Z racji tego, że hodowla *in vitro* ludzkiego norowirusa jest niezwykle skomplikowana i wymaga użycia zaawansowanych technik, mysi norowirus stał się wirusem modelowym, alternatywnym i powszechnie wykorzystywanym do badań nad replikacją i patogenezą ludzkich norowirusów oraz prac nad szczepionkami. W licznych badaniach MNV autorzy [86-88]. wykorzystywali różne szczepy myszy. Z uwagi na porównywalną podatność myszy C57Bl/6 i Balb/c, w badaniach własnych zdecydowano się na użycie tego pierwszego szczepu [89].

## **2.7. Testy do wykrywania norowirusów**

Szybkie i czułe wykrywanie norowirusa jest głównym wyzwaniem w walce z ogniskami epidemiologicznymi. Obecnie próbki biologiczne są analizowane głównie za pomocą technik wykrywających materiał genetyczny, takich jak badanie RT-PCR. Jest to jednak metoda wymagająca drogiego sprzętu, długiego czasu oczekiwania na wynik (ponad 24 godz.), ponadto musi być obsługiwana przez wykwalifikowany personel. Biosensory w tym kontekście stanowią obiecującą alternatywę dla klasycznych technik badawczych. Należą one do grupy sensorów chemicznych i charakteryzują się wysoką czułością oraz selektywnością, dzięki obecności w warstwie receptorowej materiału aktywnego biologicznie (m.in. enzymu, przeciwciała) [90]. Poza warstwą receptorową w bioczuJNIkach nieodłącznym elementem jest również przetwornik, który odbiera fizykochemiczny sygnał wytworzony w warstwie receptorowej i konwertuje go na sygnał elektroniczny. Przyszłość biosensorów wiąże się z projektowaniem nowej generacji miniaturowych urządzeń diagnostycznych, znajdujących zastosowanie w badaniach m.in.

w miejscach opieki nad pacjentem (ang. Point-of-Care Testing, POC) oraz w tzw. laboratorium na chipie (ang. Lab-on-a-Chip, LOC) [91].

## **2.8. Stres oksydacyjny**

Proliferacja wirusa przejmując funkcje komórek gospodarza i powoduje istotne zaburzenie równowagi w wewnątrzkomórkowych procesach i układach fizjologicznych, w tym w układzie redoks [92].

Stres oksydacyjny, wynikający z braku równowagi między układami antyoksydacyjnymi a toksycznymi reaktywnymi formami tlenu (ROS) [93], może być wywołany przez wiele różnych infekcji wirusowych, w tym wirus HIV 1, wirusy zapalenia wątroby typu B, C i D, wirusy opryszczki, oraz patogeny układu oddechowego, takie jak koronawirusy [94]. Jednakże stres oksydacyjny i wytwarzanie ROS są niezbędne dla wielu funkcji biologicznych i fizjologicznych. Stężenie ROS uruchamia enzymatyczne układy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, MnSOD), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR), katalaza (CAT), uważane za główne markery stresu oksydacyjnego, oraz nieenzymatyczne układy antyoksydacyjne, w tym całkowite nasycenie oksydacyjne (TOS), całkowita zdolność przeciwutleniająca (TAC) i dialdehyd malonowy (MDA) [95].

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), wraz z jej izoformami, np. MnSOD, jest jednym z głównych enzymów antyoksydacyjnych neutralizujących jony ponadtlenkowe [96]. Katalizuje głównie konwersję rodników ponadtlenkowych ( $O_2^{\cdot-}$ ) do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ), który następnie jest przekształcany w  $H_2O$  przez GPx i CAT [97]. Stres oksydacyjny spowodowany brakiem równowagi w markerach utleniacz/przeciwutleniacz, zakłócenie endogennych układów antyoksydacyjnych można określić ilościowo za pomocą całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) i całkowitego statusu oksydacyjnego (TOS) [98] oraz stężenia MDA, które jest uważane za marker stresu oksydacyjnego, dokładniej peroksydacji lipidów rozumianej jako uszkodzenie lipidów spowodowane przez ROS [99].

Infekcje wirusowe są jedną z głównych przyczyn globalnych problemów zdrowotnych [100]. Zrozumienie odpowiednich mechanizmów antyoksydacyjnych i związku między infekcją wirusową a stresem oksydacyjnym może odegrać kluczową rolę w zrozumieniu patogenezы wirusa i identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych, zwłaszcza że terapie przeciwwirusowe są często niedostępne. Dlatego zamiast działać bezpośrednio na



wirusa, skutki infekcji można złagodzić, stosując terapię ograniczającą skutki stresu oksydacyjnego.

## **2.9. Wyciągi roślinne wykorzystywane w walce z norowirusami**

Pomimo wielu przypadków hospitalizacji lub/i zgonów w wyniku infekcji norowirusowych, nie ma dostępnych żadnych zatwierdzonych leków przeciwwirusowych ani licencjonowanych szczepionek, a stosuje się jedynie leczenie objawowe [81]. Obecnie pacjenci coraz częściej zwracają się ku naturalnym związkom, które mogą znacznie skrócić czas trwania choroby lub nawet jej zapobiec [101]. Fitoskładniki wykazują silne właściwości przeciwutleniające, wynikające z obecności polifenoli lub flawonoidów. Związki te regulują poziom reaktywnych form tlenu (ROS) i wpływają na układ antyoksydacyjny organizmu, tworząc barierę obronną przed szkodnikami, grzybami czy mikroorganizmami chorobotwórczymi [102]. Oprócz wzmacniania układu odpornościowego, fitoskładniki mogą bezpośrednio wykazywać działanie wirusobójcze, a szczególnie cenne wydają się preparaty łączące obie te cechy [103]. Oregano (*Origanum vulgare* L.), kawa (*Coffea arabica* L.), konopie (*Cannabis sativa* L.), tymianek (*Thymus vulgaris* L.), pokrzywa (*Urtica dioica* L.), rozmaryn (*Rosmarinus officinalis* L.), imbir (*Zingiber officinale* Roscoe), jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea* L.), cynamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) i czosnek (*Allium sativum* L.) mają szerokie spektrum właściwości prozdrowotnych i aromatycznych, a ich zastosowanie w farmakologii wynika z biologicznych możliwości zawartych w nim składników chemicznych oraz holistycznego działania. Wykazują silne działanie bakteriobójcze względem licznych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w tym szczepów antybiotykoopornych [104]. W literaturze szeroko opisano właściwości antybiotykowe, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze i przeciw pasożytnicze omawianych surowców, a także ich preparatów wodnych i ekstraktów alkoholowych [105-129]. Ostatnia dekada to rozwój technik warzenia piwa na zimno. Badania wykazują, że warzenie na zimno chroni fenolowy pierścień aromatyczny, dzięki czemu pozwala na otrzymanie większej ilości związków kwasu fenolowego z różnych surowców roślinnych [130]. Pozwala także na uwolnienie lub rozpuszczenie niektórych substancji aktywnych bez ich rozkładu i degradacji. Wydaje się, że techniki zateżniania na zimno zwiększają skuteczność ekstraktów roślinnych w walce z wirusami [131].

### 3. CELE BADAWCZE DOKTORATU

Rozprawa doktorska obejmuje trzy cele badawcze:

1. Ocenę wpływu norowirusa na organizm zwierzęcia modelowego poprzez ocenę wpływu zakażenia MNV na zmiany histopatologiczne u myszy szczepu C56B1/6J oraz markery stresu oksydacyjnego, w szczególności na:

- a. antyoksydacyjne układy enzymatyczne:

aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR) w wybranych tkankach myszy C56B1/6J poddanych infekcji wirusem MNV

- b. antyoksydacyjne układy nieenzymatyczne:

całkowity statusu oksydacyjny (TOS), całkowitą pojemność antyoksydacyjną (TAC), stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w wybranych tkankach myszy C56B1/6J poddanych infekcji wirusem MNV.

2. Opracowanie prototypu sprzętu diagnostycznego w postaci szybkich testów antygenowych do powszechnego użytku.
3. Badanie skuteczności wirusobójczej wyciągów roślinnych i surowców pochodzenia naturalnego.

## **4. MATERIAŁ I METODY**

### **4.1. Zezwolenia i oświadczenia etyczne**

Badania przeprowadzono na myszach szczepu C56B1/6J. Wszystkie procedury doświadczalne zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (022/2022). Podczas przeprowadzania badań przestrzegano wszystkich obowiązujących instytucjonalnych i krajowych wytycznych dotyczących opieki i wykorzystywania zwierząt do celów naukowych (Dyrektywa 2010/63/UE). Liczba myszy poddanych procedurze eksperymentalnej była zminimalizowana zgodnie z zasadami „3R” humanitarnego traktowania zwierząt doświadczalnych [132]. Wszystkie zwierzęta zostały poddane humanitarnej eutanazji z wykorzystaniem dyslokacji szyjnej. Przed procedurą, myszy zostały umieszczone w komorze indukcyjnej weterynaryjnego stanowiska do znieczulenia (Équipement Vétérinaire Minerve, Esternay, Francja). Przepływ izofluranu (Aerrane; Baxter, Warszawa, Polska) ustawiono na 2,5%. Dwie minuty po tym, jak myszy zostały w pełni premedykowane, zostały przeniesione na podkładki z maską inhalacyjną i kontynuowano podawanie środka znieczulającego. Z mocnym uściskiem, umieszczając palec wskazujący i kciuk bezpośrednio za czaszką, a drugą ręką chwytając ogon tuż przy podstawie ogon tuż u podstawy, jeden silny ruch doprowadzał do zwichnięcia kręgów szyjnych. Ciągnięcie było kontynuowane, dopóki czaszka nie została całkowicie odłączona od kręgosłupa. Za każdym razem oddychanie zatrzymywało się w ciągu kilku sekund od zwichnięcia. Przed rozpoczęciem procedury nekropsji, myszy były dekapitowane.

### **4.2. Obiekt badań**

W eksperymencie wykorzystano myszy szczepu C56B1/6J sprowadzone do Centrum Inżynierii Genetycznej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z laboratorium Janvier Labs (Orleans, France). Czterotygodniowe tygodniowe myszy trzymano w plastikowych klatce (po 5 osobników) i w pełni kontrolowanych warunkach środowiska (12 h ciemność/ 12 h światło, 23 °C) z nieograniczonym dostępem do wody i pożywienia.

### 4.3. Projekt badania

Celem wykonanych badań przeprowadzonych w niniejszej pracy było zbadanie wpływu zakażenia MNV na stres oksydacyjny i zmiany histopatologiczne u myszy szczepu C56B1/6J.

Materiał do badań stanowiły myszy zdrowe i zakażone norowirusem, które podzielono na 4 grupy badawcze:

- I. Grupa kontrolna, myszy zdrowe (kontrola);
- II. Grupa 3 – myszy poddane eutanazji 3 dni po zakażeniu (3 dni);
- III. Grupa 4 – myszy poddane eutanazji 4 dni po zakażeniu (4 dni);
- IV. Grupa 7 – myszy poddane eutanazji 7 dni po zakażeniu (7 dni).

Po 7 dniach aklimatyzacji do warunków laboratoryjnych zwierzęta losowo przydzielono do 4 grup doświadczalnych.

W 8 dniu eksperymentu zwierzęta zakażano wirusem MNV (ATCC, Los Angeles, Kalifornia, USA, VR-1973), poprzez doustne podanie 50  $\mu$ l zawiesiny wirusa ( $100\text{TCID}_{50}$ ).

Po 3, 4 i 7 dniach od zakażenia myszy poddawano eutanazji. Pobierano fragmenty narządów, tj. wycinki jelita cienkiego i grubego, trzustki, wątroby, serca, płuca, nerki oraz części mózgu (przodomózgowia, śródmózgowia), w celu zbadania stresu oksydacyjnego i zmian histopatologicznych wywołanych infekcją norowirusową. Aby potwierdzić infekcję, wykonywano porównawczy test RT-PCR, test interferonu gamma oraz test neutralizacji wirusa u zakażonych osobników.

Do badań histopatologicznych użyto 100 mg pobranych tkanek. Materiał utrwalono w 4% roztworze zbuforowanej formaliny przez 48 h, przemyto wodą, odwodniono i zatopiono w parafinie, a następnie zabarwiono hematoksyliną i eozyną. Skrawki o grubości 6  $\mu$ m analizowano w mikroskopie świetlnym Nikon Eclipse 80i.

W celu zbadania stresu oksydacyjnego od zakażonych i kontrolnych myszy pobierano 100 mg mózgu, mózdzku, wątroby, płuc i nerek. Badane tkanki umieszczano w 1 ml 0,9 % NaCl i poddawano homogenizacji i sonikacji w 4 °C, a następnie natychmiast mrożono w ciekłym azocie i przechowywano do czasu analizy w temperaturze -80 °C. Stężenie białka

w tkankach oznaczano metodą Lowry'ego z albuminą osocza bydłowego jako standardem [133].

#### **4.4. Analiza markerów antyoksydacyjnych, całkowitej pojemności antyoksydacyjnej i markerów peroksydacji lipidów**

##### **4.4.1. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (EC 1.15.1.1)**

Aktywność SOD, MnSOD oznaczano metodą Oyanagui [134]. W tej metodzie oksydaza ksantynowa katalizuje wytwarzanie anionu ponadtlenkowego, który reaguje z hydroksyloaminą, tworząc jon nitrozowy. Ten ostatni w połączeniu z n-(1-naftylo)etylenodiaminą i kwasem sulfanilowym daje kombinację kolorów, którą można zmierzyć spektrofotometrycznie. Aktywność SOD wyrażono w NU/mg białka, przy czym 1 NU (jednostka azotanu) równa się 50% hamowania tworzenia jonów azotynowych.

##### **4.4.2. Aktywność katalazy (CAT) (EC 1.11.1.6)**

Aktywność CAT określano metodą Aebi [135]. W tej metodzie homogenat jest mieszany z perhydrolem w 50 mM buforze TRIS/HCl, pH 7,4, a reakcja jest rozpoczynana przez dodanie świeżo przygotowanego nadtlenu wodoru. Szybkość rozkładu nadtlenu wodoru nadtlenu wodoru można zmierzyć spektrofotometrycznie przy 240 nm. Aktywność CAT jest wyrażana jako jednostek na 1 g białka (IU/g białka). Aktywność CAT została określona przy użyciu metody Aebi [135] i wyrażona w jednostkach na 1 g białka (IU/g białka).

##### **4.4.3. Aktywność reduktazy glutationowej (GR) (EC 1.8.1.7)**

Aktywność GR określano metodą kinetyczną, która wyraża się w  $\mu$ molach fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) zużytego w ciągu 1 minuty na 1 g białka (IU/g białka) dla ocenianych próbek [136]. Metoda ta opiera się na zmianach stężenia NADPH reagującego z utlenionym glutationem. Zmiany absorbancji przy 340 nm mierzono za pomocą czytnika PERKIN ELMER Victor X3 (PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone).

##### **4.4.4. Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) ((EC 1.11.1.9)**

Aktywność GPx mierzono metodą kinetyczną według metody Mannervika [137], z nadtlaniem t-butylu jako substratem. W tej reakcji utleniony glutation (GSSG) regeneruje się w obecności reduktazy glutationowej (GR) i NADPH. Aktywność GPx wyrażona jest

w  $\mu\text{mol}$ ach NADPH utlenionego w ciągu 1 minuty na 1 mg białka (IU/mg białka) dla wybranych tkanek.

#### **4.4.5. Aktywność S- transferazy glutationowej (GST) (EC 2.5.1.18)**

Aktywność GST oszacowano za pomocą metody kinetycznej Habiga i Jakoby'ego [138]. Do próbek dodawano mieszaninę reakcyjną zawierającą zredukowany glutation. Po wstępnej stabilizacji dodawano 1-chloro-2,3-dinitrobenzen (w roztworze alkoholu etylowego) i monitorowano zmiany absorbancji za pomocą czytnika PERKIN ELMER Victor X3 przy długości fali 340 nm przez co najmniej 3 minuty. Aktywność GST wyrażano jako  $\mu\text{mole}$  tioeteru utworzonego w ciągu 1 minuty na 1 g białka (IU/g białka) [138].

#### **4.4.6. Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC)**

Całkowitą pojemność antyoksydacyjną mierzono metodą Erela [139] W tej metodzie bezbarwna zredukowana cząsteczka ABTS (2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) utlenia się do niebiesko-zielonego kationu  $\text{ABTS}^+$ . Zmieszanie  $\text{ABTS}^+$  z dowolną substancją, która może być utleniona, powoduje redukcję  $\text{ABTS}^+$  do pierwotnej bezbarwnej formy. Całkowitą pojemność antyoksydacyjną wyrażono w  $\text{mmol/l}$ .

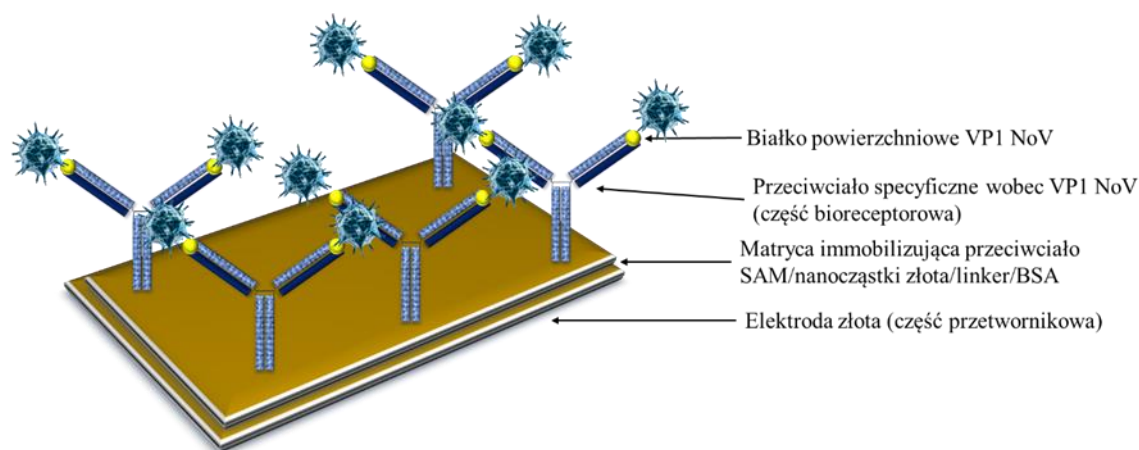
#### **4.4.7. Stężenie dialdehydu malonowego (MDA)**

Stężenie dialdehydu malonowego (MDA) mierzono metodą Ohkawy i wsp. [140] wykorzystującą reakcję z kwasem tiobarbiturowym. Stężenie MDA w osoczu obliczano względem krzywej wzorcowej przygotowanej z użyciem 1,1,3,3-tetraetoksypropanu i wyrażonej w  $\mu\text{mol/l}$ .

### **4.5. Opracowanie prototypu sprzętu diagnostycznego w postaci szybkich testów antygenowych do detekcji norowirusów. Testy do powszechnego użytku.**

Przygotowanie biosensora wykorzystującego w warstwie receptorowej przeciwciała, składało się z wieloetapowej procedury. Do konstrukcji immunosensora wykorzystano elektrodę złotą zmodyfikowaną nanocząstkami złota i przeciwciała, które selektywnie wiąże się z białkiem na powierzchni wirusa. Wirion NoV budują 2 białka strukturalne VP1 i VP2 oraz 6 białek niestrukturalnych. Białko VP1 oddziałuje m.in. w kontaktach dimerycznych, które zwiększają stabilność kapsydu i odgrywa istotną rolę w wiązaniu receptora jak i reaktywności immunologicznej, co przypuszczalnie jest związane z

podatnością organizmu na infekcje norowirusowe. Jest też białkiem usytuowanym na zewnątrz komórki, dzięki czemu łatwo może zostać związane z przeciwciałem – co stanowi podstawę do stwierdzenia obecności wirusa podczas konstrukcji bioczuJNIKA (Ryc. 2).



**Rycina 2.** Budowa warstwy aktywnej bioczuJNIKA. Szczegółowe informacje na temat budowy bioczuJNIKA przedstawiono w Suplemencie.

Elektrodę po każdym etapie przepłukiwano w buforze PBS oraz wodą dejonizowaną. W celu sprawdzenia prawidłowej modyfikacji kolejnymi związkami na powierzchni elektrody i wykonania stabilnej warstwy, po każdym etapie wykonywano zdjęcie skaningowym mikroskopem elektronowym (SEM), jak również oceniano dzięki zastosowaniu elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) i cyklicznej woltamperometrii (CV).

Do badań używano próbek uzyskanych z fragmentów żywności (sałata lodowa, borówka amerykańska, maliny właściwej, i ostrygi (z Francji i Holandii)) o wymiarach 5 mm x 5 mm, drobno krojono skalpelem i zawieszano w buforze pomiarowym. Bakterie (w stężeniu  $1,5 \times 10^8$  CFU) wywołujące objawy podobne do infekcji norowirusem (*Enterococcus faecalis*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) uzyskane z Katedry Patologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, mieszano z wirusem w stosunku 1:1. Do izolacji materiału genetycznego używano komercyjnego zestawu Total RNA Maxi (A&A Biotechnology, Polska). Do przeprowadzenia RT-qPCR wykorzystywano komercyjny zestaw SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step (BIO-76005)(BLIRT, Polska). Sondy i startery zastosowano w oparciu o dane literaturowe [141].

#### **4.5.1. Prototyp czujnika szybkiego wykrywania norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych**

Prototyp czujnika do szybkiego wykrywania norowirusów oraz test przygotowanego czujnika szczegółowo opisano w Suplemencie (podrozdział: Jednorazowy czujnik – test).

Aby przełożyć funkcjonalność biosensora na możliwość odczytania i konwersji otrzymanych wyników do informacji czytelnej i jasnej dla użytkownika testu skonstruowano urządzenie zbierające pomiary o nazwie Aquanostic Reader. Urządzenie to pozwala na odczytanie wyników biosensora. Szczegółowe informacje na temat urządzenia zbierającego pomiary Aquanostic Reader przedstawiono w Suplemencie. Zasady działania testu przedstawiono w Suplemencie.

##### **4.5.1.1. Przygotowanie testu**

Procedura została opracowana na bazie w/w badań eksperymentalnych, gdzie potwierdzono wysoką stabilność i selektywność warstwy wykrywającej. Inkubacja testu przeprowadzona została na 7 z 8 złotych pól, z jednym polem pełniącym funkcję kontroli inkubacji testu. Szczegółowe informacje na temat całego procesu przygotowawczego przedstawiono w Suplemencie.

##### **4.5.1.2. Przygotowanie próbek kontroli pozytywnej i negatywnej do walidacji testu**

Opisane próbki, pochodzące z różnych źródeł, zostały przygotowane zgodnie z protokołem. Materiał żywnościowy, taki jak sałata lodowa (*Lactuca sativa var. crispa* L.), borówka amerykańska (*Vaccinium corymbosum* L.), malina właściwa (*Rubus idaeus* L.), krewetka tygrysia (*Penaeus monodon* Fabricius) oraz ostryga pacyficzna (*Crassostrea gigas* Thunb.) uzyskano ze sklepu Selgros. Bakterie: *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, uzyskano z Katedry Patologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Polska. Ludzkiego norowirusa uzyskano z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Próbki potencjalnego materiału zakaźnego o wymiarach 2 mm x 2 mm rozdrobniono skalpelem i zawieszono w buforze pomiarowym 500 µl. Kontrolę pozytywną mieszano z 100 µl norowirusa. Następnie przefiltrowano przez sitko komórkowe PluriStrainer Mini 40 µm (PluriSelect cat. 43-10040-40, pluriSelect GmbH Feldafing, Niemcy) w celu usunięcia pozostałości tkankowych. Próbkę każdego patogenu wywołującego objawy



podobne do zakażenia NoV (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*) zbadano w stężeniu  $1,5 \times 10^8$  CFU, a kontrola pozytywna została zmieszana z wirusem w stosunku objętościowym 1:1. Cały proces przygotowania próbek został przeprowadzony zgodnie z protokołem.

#### 4.5.1.3. Procedura pomiarowa

Przeprowadzenie pomiaru:

1. Włączenie komputera, aplikacji pomiarowej oraz podłączenie urządzenia Aquanostic Reader;
2. Przygotowanie próbki;
3. Nakropienie buforu na segment pomiarowy;
4. Rozpoczęcie 5 pomiarów stabilizujących;
5. Nałożenie próbki w 6 cyklach pomiarów;
6. Analiza wyników – 4 cykle pomiarów;
7. Zakończenie pomiarów i uzyskanie wyniku.

Pomiary wykonano dla częstotliwości: 1000.0 mHz, 641,529 mHz, 411,56 mHz, 264,028 mHz, 169,381 mHz, 108,663 mHz, 69,7106 mHz, 44,7214 mHz, 28,6901 mHz, 18,4055 mHz, 11,8077 mHz, 7,57497 mHz, 4,85956 mHz, 3,11755 mHz i 2 mHz. Do pomiarów użyto buforu Tris-HCl 100 mM, KCl 0,5 mM,  $K_3Fe(CN)_6$  1 mM,  $K_2Fe(CN)_6$  7,5 mM.

#### 4.5.2. RT-qPCR

Do izolacji materiału genetycznego z próbek użytych w badaniu zastosowano zestaw Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology, Polska). Do reakcji ilościowej polimerazy łańcuchowej (RT-qPCR) użyto termocyklera CFX Connect Bio-Rad. Do identyfikacji materiału genetycznego użyto zestawu SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step (BIO-76005) (BLIRT, Polska). Zastosowano następujące startery i sondy, wybrane na podstawie literatury [142] i będące sekwencjami specyficznymi dla regionów kodujących białko kapsydowe VP1:

Ludzki norowirus GI

COG1-F CGYTGGATGCGNTTYCATGA

COG1-R CTTAGACGCCATCATCATTYAC

RING1 FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA

Ludzki norowirus GII

COG2-Fwobble CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGA

COG2-R TCGACGCCATCTTCATTCACA

RING2-AL-TPb FAM-TGGGAGGGSGATCGCRATCT

Mysi norowirus

MNV-F CCGCAGGAACGCTCAGCAG

MNV-R GGYTGAATGGACGGCCTG

MNV-TPd FAM-ATGAGTGATGGCGCA

Warunki reakcji RT-qPCR:

10 min w 45 °C i 2 min w 95 °C; następnie 45 cykli po 5 s w 95 °C i 20 s w 55 °C.

#### **4.6. Przygotowanie wyciągów roślinnych i surowców pochodzenia naturalnego do oceny zdolności wirusobójczych i przeciwutleniających ekstraktów roślinnych**

Do oceny cech wirusobójczych i przeciwutleniających ekstraktów roślinnych, wykorzystano wyciągi roślinne przygotowane z: oregano (*Origanum vulgare* L.), kawa (*Coffea arabica* L.), konopie (*Cannabis sativa* L.), tymianek (*Thymus vulgaris* L.), pokrzywa (*Urtica dioica* L.), rozmaryn (*Rosmarinus officinalis* L.), imbir (*Zingiber officinale* Roscoe), jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea* L.), cynamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) i czosnek (*Allium sativum* L.), przygotowanych zgodnie z techniką zaparzania i zagęszczania na zimno. Zbadano ich właściwości przeciwwirusowe oraz zawartość związków fenolowych, flawonoidów i aktywność przeciwutleniającą, w celu potencjalnego zastosowania jako dodatku do konwencjonalnego leczenia objawowego w infekcjach norowirusowych. Ziarna kawy pochodziły z palarni kawy Etno Cafe (Wrocław, Polska). Pozostałe materiały roślinne pochodziły ze sklepu zielarsko-medycznego Herbavit (Herbavit, Wrocław, Polska) i zostały wysuszone w sposób konwekcyjny. Metoda ta polega na usuwaniu wilgoci z materiału roślinnego przy pomocy gorącego powietrza. Do przygotowania ekstraktów roślinnych zastosowano metodę parzenia i zagęszczania na zimno.

Do zbadania zawartości związków fenolowych wykorzystano metodę Folina-Ciocalteu [143]. Redukcja stężenia kationorodnika ABTS<sup>+</sup> posłużyła jako miara aktywności przeciwutleniającej. Zawartość flawonoidów zbadano przy pomocy metody chlorku glinu według Sembiring i wsp. [144].

Każdy oceniany ekstrakt roślinny został poddany testowi cytotoksyczności w rozcieńczeniach od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-8</sup>, wraz ze związkami referencyjnymi – epikatechiną (EPI) i

kwasmem kawoilochinowym (CQA). Cytotoksyczność została zbadana na linii komórkowej RAW 264.7. W tym celu usuwano płyn z dołków 96-dołkowej płytki, pokrytych komórkami hodowli. Następnie dodawano 50  $\mu$ l DMEM (minimum essential medium) i 50  $\mu$ l roztworu MTT do każdego dołka. Płytkę inkubowano w 37 °C przez 3 h. Po tym czasie dodawano 150  $\mu$ l rozpuszczalnika MTT do każdego z dołków, zawijano płytkę w folię i wytrząsano na wytrząsarce orbitalnej przez 15 min. Absorbancję odczytywano przy długości fali 590 nm w ciągu 1 h.

#### **4.7. Analiza statystyczna**

##### **4.7.1. Analiza statystyczna parametrów antyoksydacyjnych**

Normalność rozkładów oceniano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Do porównań w grupie badawczej i w grupach norowirusów w zależności od rodzaju tkanki wykorzystano analizę ANOVA Kruskala-Wallis. W obrębie pojedynczej tkanki porównano grupę badaną z grupą kontrolną za pomocą testu U Manna-Whitneya. W opisie wykorzystano medianę (dolny-górny kwartyl) Me (Q1-Q3). Przeprowadzone testy miały charakter dwustronny, a poziom istotności przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ . Obliczenia wykonano w programie Statistica (TIBCO Software Inc. (2017). Statistica (oprogramowanie do analizy danych), wersja 13. <http://statistica.io>).

##### **4.7.2. Analiza statystyczna ekstraktów wyciągów roślinnych o działaniu przeciwwirusowym**

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej przeprowadzonej w programie Statistica 13.0 (StatSoft Polska, Kraków, Polska). Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji, w której średnie z testu post-hoc porównano za pomocą testu Duncana. Poziom istotności przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ .

## 5. WYNIKI

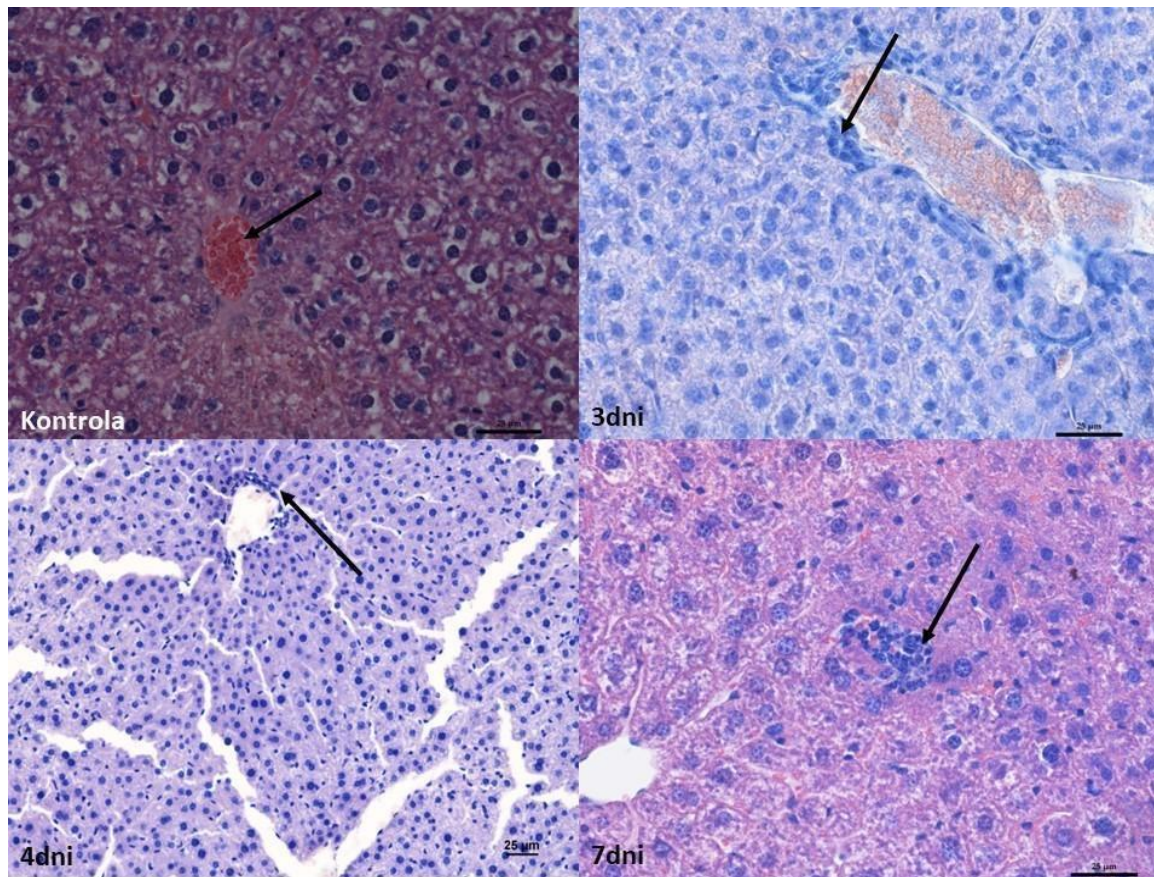
### 5.1. Analiza histopatologiczna

U wszystkich badanych osobników uśmierconych po 3, 4 i 7 dniach od zakażenia norowirusem stwierdzono zmiany histopatologiczne w tkankach wątroby i tkance mózgowej (Ryc. 3-5) . U wybranych osobników z grup po 3, 4 i 7 dniach zmiany odnotowano w płucach i nerkach (Ryc. 6). W jelicie cienkim, grubym, trzustce i sercu u żadnego ze zwierząt nie obserwowano obrazu odbiegającego od obrazu w grupie kontrolnej.

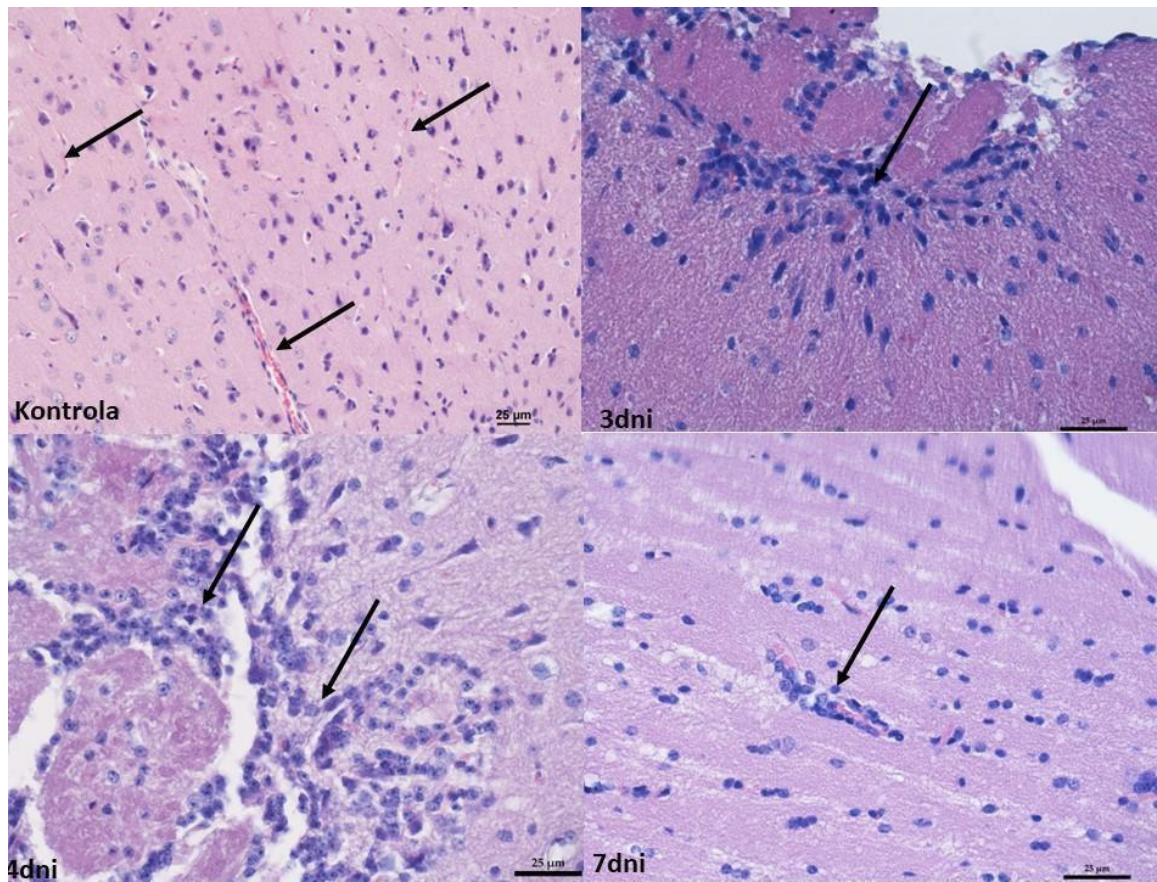
U zwierząt z grup po 3, 4 i 7 dniach od zakażenia, w obrębie naczyń wewnątrzrzazikowych wątroby i triad wątrobowych, w porównaniu do grupy kontrolnej, widoczne były limfocytarne nacieki okołonaczyniowe (Ryc. 3). W tkance wątroby tych zwierząt odnotowano hepatocyty dwujądrowe, które wskazują na zachodzące procesy naprawcze narządu (Ryc. 3).

W tkance mózgowej grup po 3,4 i 7 dniach od zakażenia, nacieki zaobserwowano w naczyniach oponowych mózdzku i śródmózgowia, głównie w istocie białej (Ryc. 4.) Zauważono również gąbczaste zmiany istoty białej spowodowane obrzękiem mózdzku w grupach badanych w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 4 i 5).

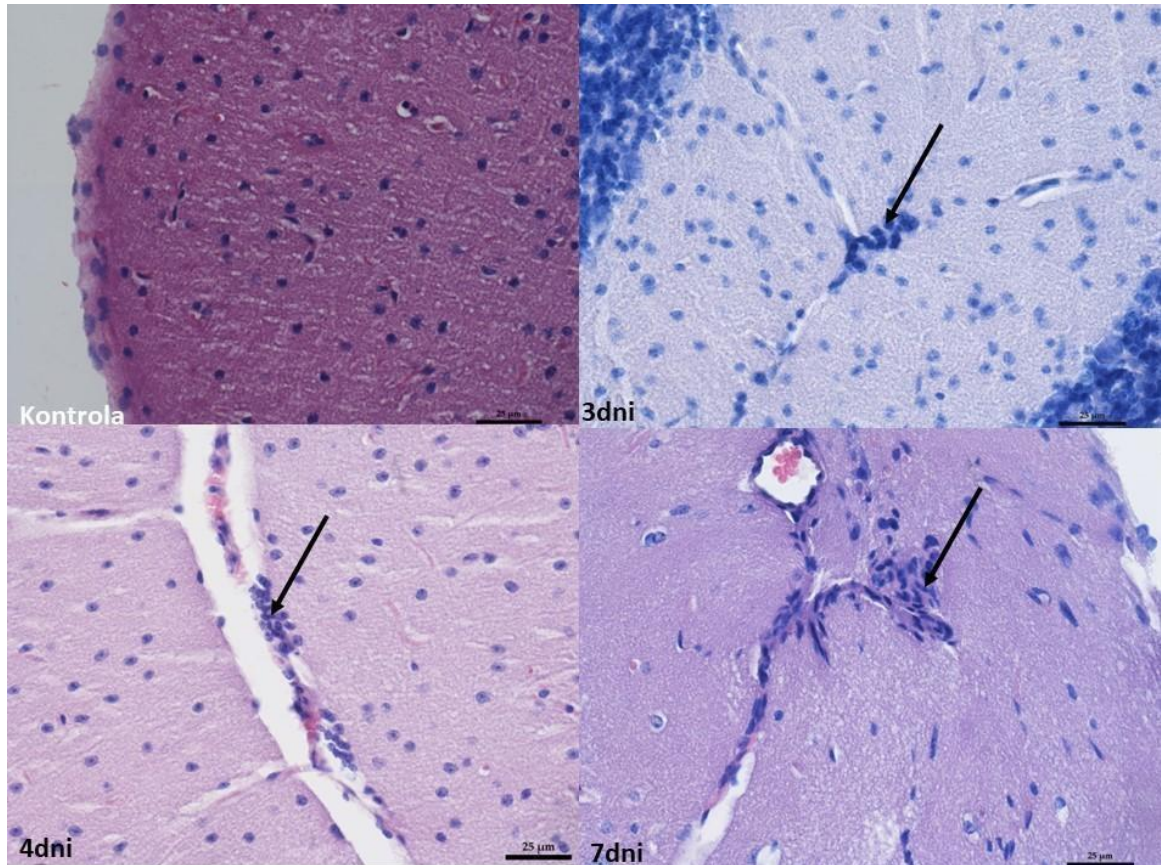
W nerkach i płucach osobników zakażonych zaobserwowano niewielkie nacieki okołonaczyniowe. Uznano, że zmiany te nie są związane z infekcją norowirusem.



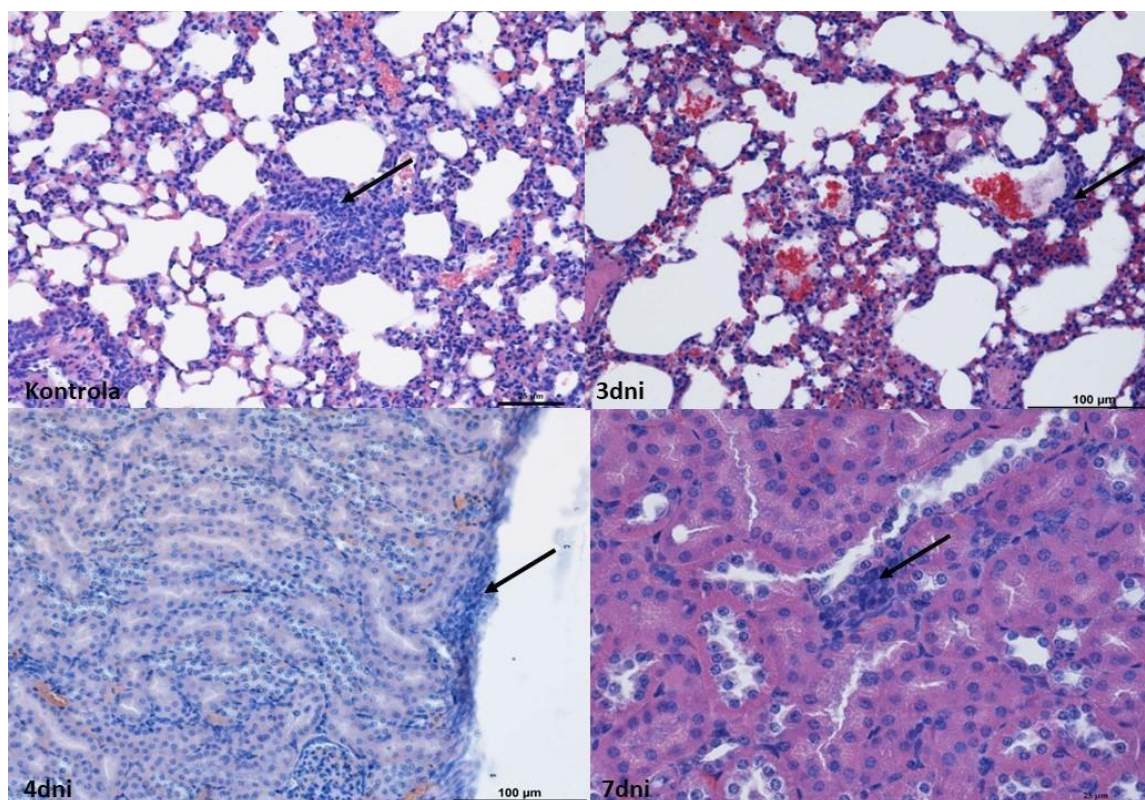
**Rycina 3.** Zmiany histopatologiczne w tkance wątroby myszy szczepu C56B1/6J poddanych infekcji norowirusowej (grupa kontrolna vs gr po 3, 4 i 7 dniach od zakażenia). Grupa kontrolna – prawidłowa struktura hepatocytów otaczających żyłę centralną (strzałka). Pow. 400×. Łagodny naciek limfocytów wokół naczyńia krwionośnego (strzałka) po 3. (Pow. 400×) i 4. dniu. (Pow. 200×). Po 7. dniu naciek limfocytów w zrębie wątroby (strzałka). Pow. 400x.



**Rycina 4.** Zmiany histopatologiczne obserwowane w tkance śródmózgowia myszy szczepu C56B1/6J poddanych infekcji norowirusowej oraz w grupie kontrolnej. Grupa kontrolna – liczne naczynia krwionośne w śródmózgowiu (strzałka). Pow. 200×. Po 3. i 4. dobie okołonaczyniowy naciek limfocytów w istocie białej (strzałka). Pow. 400×. (D) po 7. dobie łagodny okołonaczyniowy naciek limfocytów w istocie białej (strzałka). Pow. 400×.



**Rycina 5.** Zmiany histopatologiczne w tkance mózdzku myszy szczepu C56B1/6J podanych infekcji norowirusem oraz w grupie kontrolnej. Grupa kontrolna — normalny obraz niezmiętej kory pokrytej gąbczastymi zmianami. Pow. 400×. W 3., 4. i 7. dobie okołonaczyniowy naciek limfocytów w istocie białej (strzałka). Pow. 400×.



**Rycina 6.** Zmiany histopatologiczne w tkance płuc i nerek myszy szczepu C56B1/6J podanych infekcji norowirusem oraz w grupie kontrolnej. Płuca: Naciek limfocytarny w grupie kontrolnej oraz w 3. dniu. Widoczna tkanka limforetikularna (strzałka) obok oskrzelików w grupie kontrolnej oraz w pęcherzykach płucnych w 3. dniu. Podobne zmiany stwierdzono u osobników z grup 3., 4. i 7. dniu. Pow. 100×. Nerki: naciek limfocytarny u zwierząt w 3., 4. i 7. dniu. W 4. dobie widoczny łagodny naciek limfocytów (strzałka) pod torebką nerki i pomiędzy kanalikami proksymalnymi. Podobne zmiany zaobserwowano w pozostałych okresach oraz w grupie kontrolnej. Dzień czwarty — Pow. 200×, siódmy — Pow. 400×.



## 5.2. Analiza parametrów antyoksydacyjnych

Stwierdzono różnice istotne statystycznie w parametrach stresu oksydacyjnego takich jak aktywność SOD, MnSOD, GST, GPx, GR i CAT, poziom TAC i TOS oraz stężenie MDA. Badany materiał porównano pomiędzy grupą kontrolną oraz myszami zainfekowanymi mysim norowirusem poddanymi eutanazji po 7 dniach od infekcji (Tabela I).

W niniejszych badaniach stwierdzono wyższą aktywność SOD w tkance wątroby myszy kontrolnych w porównaniu do zakażonych norowirusem (Tabela I). Podobnie statystycznie istotne różnice wykazano w aktywności MnSOD, której wyższe wartości u myszy kontrolnych zaobserwowano w wątrobie, ale niższe w tkankach nerek. Dalsze porównania między zwierzętami w obu grupach w obrębie poszczególnych tkanek wykazały wyższą aktywność GR w mózgu, mózdzku i wątrobie myszy zakażonych norowirusem w porównaniu do myszy kontrolnych. Zaobserwowano też wyższą aktywność GR w tkankach płuc i nerek myszy kontrolnych w porównaniu do zakażonych, wyższą aktywność CAT w mózdzku, płucach i nerkach myszy zakażonych i zwiększoną aktywność CAT w wątrobie myszy kontrolnych (Tabela I). Porównując aktywność GPx w poszczególnych tkankach zwierząt kontrolnych i zwierząt zakażonych norowirusem (Tabela I), stwierdzono wyższą aktywność GPx w mózdzku i płucach myszy kontrolnych, a także w tkance wątroby myszy zakażonych norowirusem. Dodatkowo porównanie to ujawniło wyższą aktywność GST w wątrobie myszy zakażonych norowirusem (Tabela I). Ponadto zaobserwowano wyższy poziom TAC w tkance mózgowej, ale niższy poziom w mózdzku i tkankach wątroby myszy zakażonych norowirusem w porównaniu z myszami kontrolnymi. Zaobserwowano wyższe poziomy TOS w mózgu i wątrobie, ale niższe poziomy TOS w tkankach nerek myszy zakażonych norowirusem w porównaniu z grupą kontrolną. Wreszcie, stężenie MDA było wyższe w tkance wątroby myszy kontrolnych w porównaniu z myszami zakażonymi norowirusem.

**Tabela I.** Poziomy markerów stresu oksydacyjnego w tkankach mózgu, mózdzku, wątroby, płuc i nerek pobranych od wszystkich myszy kontrolnych (n = 7) i myszy zakażonych MNV, uśmierconych 7 dni po podaniu wirusa (n = 7). Wyniki przedstawiono jako medianę z dolnym i górnym kwartylem (Me (Q1-Q3)). p – istotność statystyczna (p ≤ 0,05).

<b>Marker stresu oksydacyjnego</b>	<b>Grupa</b>	<b>Mózg</b>	<b>Mózdzek</b>	<b>Wątroba</b>	<b>Pluca</b>	<b>Nerka</b>	<b>P</b>
<b>SOD</b> (NU/mg białka)	kontrola	11,1 (9,0–14,1)	15 (11,6–18,9)	3,6 (3,3–4,8)	4,1 (2,5–5,7)	5,4 (4,8–6,8)	< 0,001
	norowirus	12 (11,2–13,4)	15 (11,5–15,5)	2,7 (2,4–2,8)	4,9 (3,2–6,3)	5,9 (5,0–6,1)	< 0,001
	P kontrola vs. norowirus	0,443	0,443	< 0,01	0,523	0,701	
<b>MnSOD</b> (NU/mg białka)	kontrola	3,1 (2,1–4,1)	2,5 (1,4–3,7)	2,4 (2,2–2,9)	2,6 (2,3–3,0)	1,9 (1,8–2,0)	< 0,05
	norowirus	2,7 (2,6–3,0)	2,6 (2,3–2,8)	2 (1,9–2,2)	2,6 (2,2–2,8)	2,2 (2,1–2,4)	< 0,01
	P kontrola vs. norowirus	0,609	0,609	< 0,05	0,701	< 0,05	
<b>GR</b> (j.m./g białka)	kontrola	26,6 (25,7–28,0)	26,8 (24,9–27,5)	5,7 (5,4–7,4)	13,5 (12,4–15,9)	1,8 (1,5–2,4)	< 0,001
	norowirus	15,4 (15,0–17,8)	21,9 (19,3–22,6)	0,3 (0,2–0,3)	18,3 (17,8–18,4)	3,6 (2,6–4,7)	< 0,001
	P kontrola vs. norowirus	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,05	
<b>CAT</b> (j.m./g białka)	kontrola	184,1 (141,2–187,7)	133,2 (108,1–147,1)	396,4 (382,7–437,5)	140,3 (133,4–144,3)	290,8 (264,3–298,1)	< 0,001
	norowirus	154 (117,6–179,8)	193,5 (186,3–238,9)	225,6 (204,1–247,3)	180,8 (166,1–187,7)	358,2 (355,0–374,5)	< 0,001

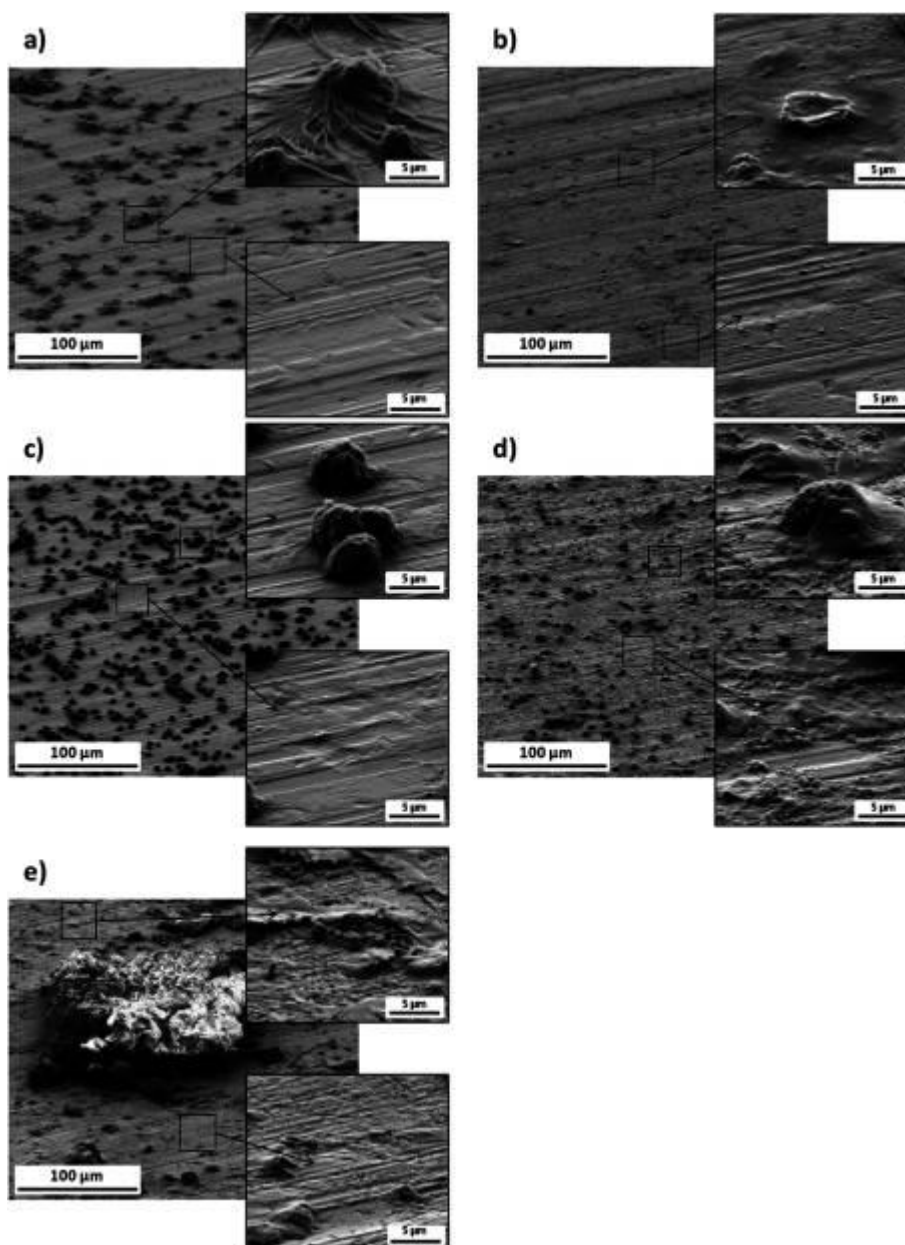
<b>Marker stresu oksydacyjnego</b>	<b>Grupa</b>	<b>Mózg</b>	<b>Móźdżek</b>	<b>Wątroba</b>	<b>Pluca</b>	<b>Nerka</b>	<b>P</b>
	P kontrola vs. norowirus	0,25	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	
<b>GPx</b> (j.m./g białka)	kontrola	446 (257–555)	488 (413–522)	65 (60–69)	496 (485–530)	270 (208–401)	< 0,001
	norowirus	309 (271–358)	256 (205–373)	135 (113–150)	389 (384–399)	250 (245–270)	< 0,001
	P kontrola vs. norowirus	0,201	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,443	
<b>GST</b> (j.m./g białka)	kontrola	6,4 (6,2–7,0)	8,1 (6,8–8,8)	3,9 (3,1–4,6)	6,2 (5,2–7,6)	5,6 (5,2–6,6)	< 0,001
	norowirus	6,5 (5,4–6,8)	7,5 (6,4–9,6)	5,9 (4,7–7,5)	6,4 (8,9–7,0)	5,1 (5,1–5,2)	< 0,05
	P kontrola vs. norowirus	0,609	1	< 0,01	0,798	0,196	
<b>TAC</b> (mmol/g białka)	kontrola	0,34 (0,32–0,38)	0,41 (0,38–0,46)	0,32 (0,31–0,36)	0,26 (0,22–0,27)	0,33 (0,32–0,44)	< 0,001
	norowirus	0,43 (0,41–0,53)	0,16 (0,14–0,18)	0,18 (0,11–0,24)	0,25 (0,21–0,34)	0,47 (0,44–0,48)	< 0,001
	P kontrola vs. norowirus	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,256	0,07	
<b>TOS</b> (j.m./g białka)	kontrola	0,45 (0,29–0,53)	0,46 (0,43–0,56)	0,4 (0,38–0,46)	2,48 (2,20–2,76)	0,62 (0,60–0,71)	< 0,001
	norowirus	0,74 (0,67–0,90)	0,55 (0,51–0,59)	0,87 (0,86–1,07)	1,97 (1,54–2,14)	0,43 (0,40–0,46)	< 0,001

Marker stresu oksydacyjnego	Grupa	Mózg	Mózdzek	Wątroba	Pluca	Nerka	P
	P kontrola vs. norowirus	< 0,01	0,097	< 0,01	0,055	< 0,01	
MDA (j.m./g białka)	kontrola	7,1 (6,5–8,2)	14,3 (13,5–15,1)	2,9 (2,8–3,6)	3,3 (3,1–3,8)	2,7 (2,1–3,2)	< 0,001
	norowirus	7,2 (6,7–8,4)	12,1 (11,2–12,3)	2,4 (2,1–2,6)	3,7 (3,2–4,6)	3,1 (2,8–3,8)	< 0,001
	P kontrola vs. norowirus	0,898	0,055	< 0,05	0,523	0,246	

Skróty: CAT – aktywność katalazy; GPx – aktywność peroksydazy glutationowej, GR – aktywność reduktazy glutationowej; GST – S-transferaza glutationowa, MDA – stężenie dialdehydu malonowego, MnSOD – aktywność dysmutazy ponadtlenkowej Mn, SOD – aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, TAC – całkowita pojemność antyoksydacyjna; TOS – całkowity status oksydacyjny.

### **5.3. Opracowanie prototypu sprzętu diagnostycznego w postaci szybkich testów antygenowych do detekcji norowirusów. Testy do powszechnego użytku**

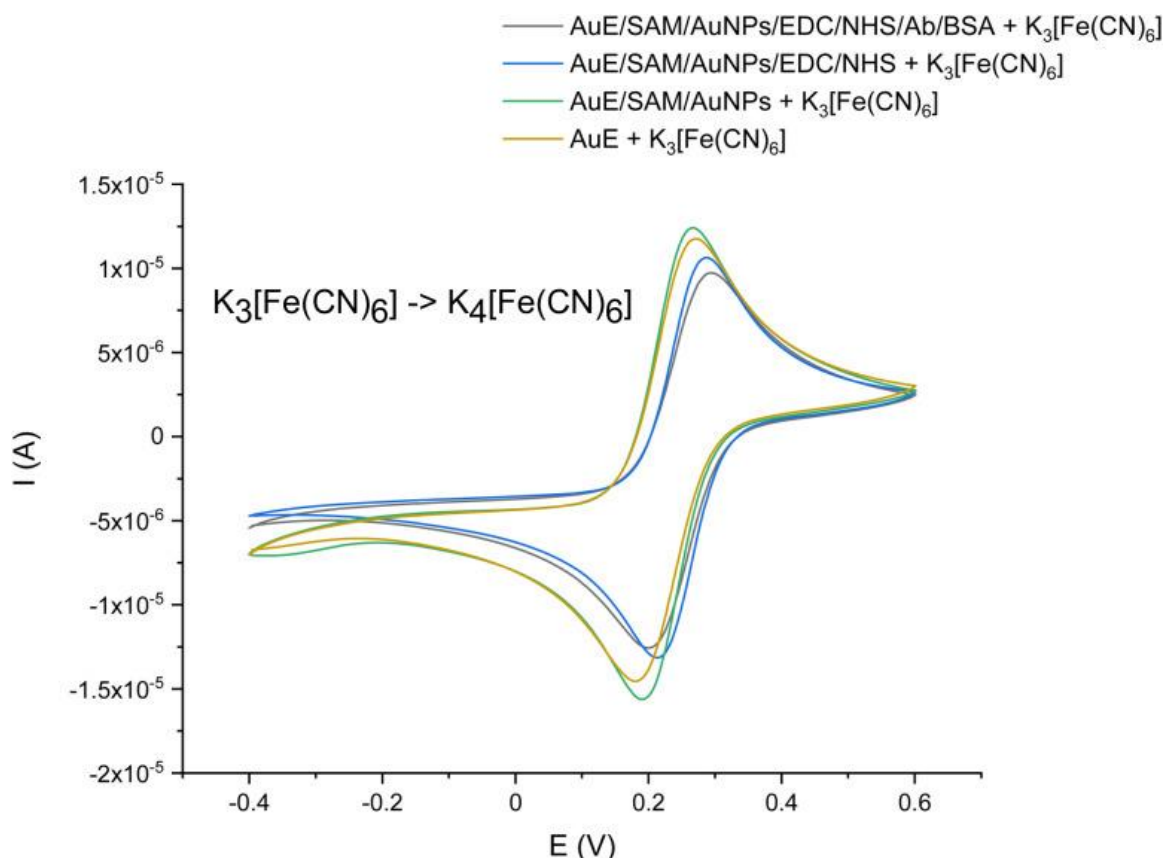
Na początku po każdym etapie modyfikacji elektrody zmiany w morfologii powierzchni obserwowano za pomocą SEM (Ryc. 7a). Początkowy etap polegał na utworzeniu SAM z l-cysteiny, która charakteryzuje się warstwą o dość zróżnicowanym kulistym kształcie (Ryc. 7b). Morfologia samych nanocząstek złota, które służyły jako matryca kotwicząca białka w warstwie bioreceptorowej, jak i element przewodzący w badaniach elektrochemicznych, pozwoliła na utworzenie w dużej mierze jednorodnej warstwy, która zawierała kilka rozproszonych, bardzo drobnych aglomeratów, a także stosunkowo duże, płaskie skupiska o średnicy kilku mikrometrów (Ryc. 7c). Po wprowadzeniu nanocząstek złota na powierzchnię SAM (Ryc. 7b) obraz powierzchni elektrody (przedstawiony na Rys. 8c) pokazał gęściej „upakowaną” i nieliczne już mikrometrowe aglomeraty o kłaczkowatej strukturze. Po modyfikacji SAM/AuNPs powierzchnia została pokryta warstwą linkera EDC/NHS (Rys. 7d). Stosunkowo gładka i ciągła warstwa EDC/NHS pokryła mniejsze skupiska SAM i nanocząstek złota lub częściowo osadziła większe. Na tak wykonanej warstwie przeciwciała zostało unieruchomione i zobrazowane (Ryc. 7e). Widoczna jest zmiana morfologii powierzchni i drobna ziarnistość w obszarach, w których warstwa EDC/NHS była najcieńsza. Ponadto zaobserwowano kilka płaskich skupisk większych niż 100 mikrometrów, powstały one w wyniku unieruchomienia przeciwciała na powierzchni zmodyfikowanej elektrody.



**Rycina 7.** Zdjęcia z mikroskopu SEM powierzchni po każdym etapie modyfikacji. Obrazy SEM morfologii powierzchni elektrody modyfikowanej za pomocą: SAM (a), AuNPs (b), SAM/AuNPs (c), SAM/AuNPs/EDC/NHS (d), SAM/AuNPs/EDC/NHS/przeciwciała (e).

Prawidłowe osadzanie kolejnych warstw na AuE zobrazowano również z zastosowaniem techniki woltamperometrii cyklicznej (CV), stosując modelowy związek redox ferri/ferrocyanek jako analit. Na otrzymanym woltamperogramie widać odwracalną reakcję utleniania-redukcji analitu z odstępem między szczytowym około 30 mV między wartością szczytową prądu anodowego a katodowego wobec wszystkich typów elektrod (elektrody czystej oraz z kolejnymi warstwami receptorowymi). Żółta krzywa przedstawia wyniki sygnału utleniania wobec analitu czystej elektrody złotej. Jak widać, prąd szczytowy pików anodowych wynosi około 80  $\mu\text{A}$ . Natomiast na wykresie przedstawiającym elektrodę złotą, zmodyfikowaną warstwą półprzewodzącą, czyli AuNPs

prąd szczytowy znacznie wzrósł – do wartości około 125  $\mu\text{A}$  (Ryc. 8 zielona krzywa). Następnie po dodaniu kolejnej warstwy linkera – EDC/NHS i przeciwciała obserwowany jest spadek natężenia prądu, co jest związane z faktem, iż wytworzona ściśle upakowana warstwa, która powstaje w wyniku kowalencyjnego przyłączenia przeciwciała, blokuje dostęp do powierzchni elektrody (przetwornika) i niejako blokuje przepływ elektronów z warstwy bioreceptorowej do elektrody.

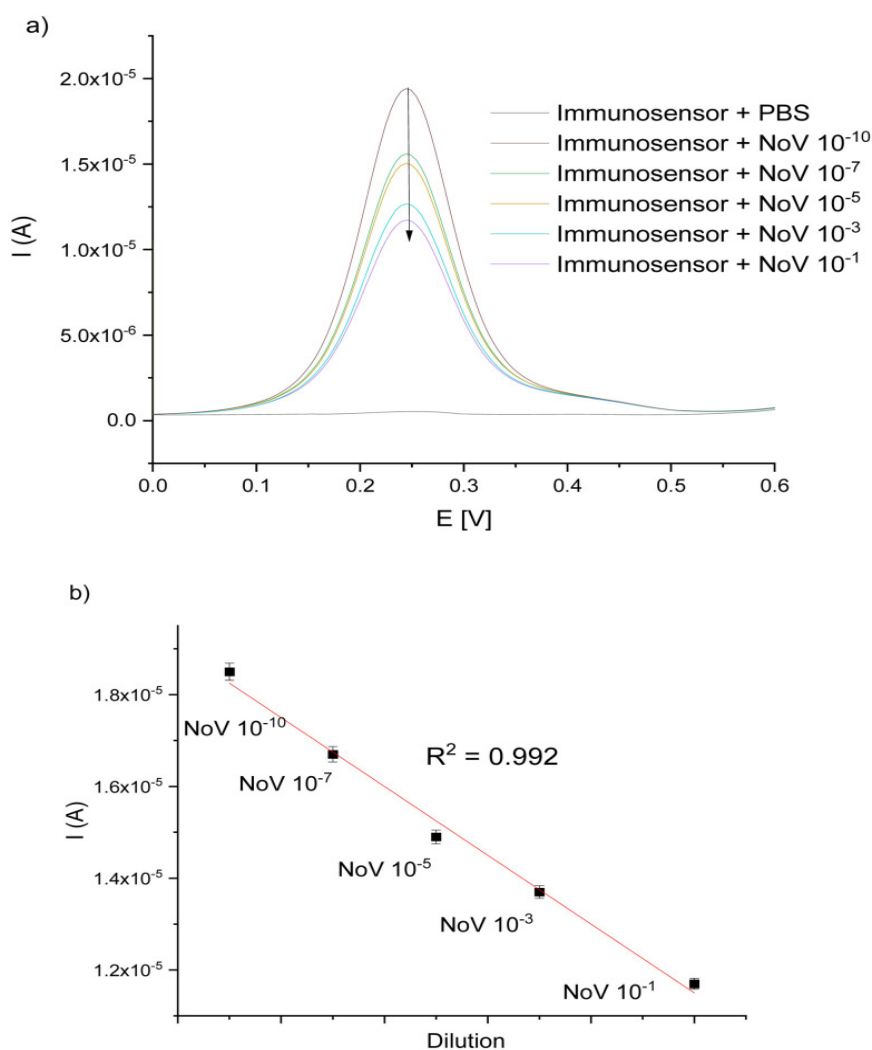


**Rycina 8.** Widmo cyklicznego woltamogramu dla każdej z warstw na złotej elektrodzie. Woltamogram CV, przedstawiający przygotowanie elektrochemicznego immunosensora do wykrywania NoV przy użyciu 5 mM sondy redoks żelazo/żelazocyjanek,  $\text{KNO}_3$  stosowanej jako elektrolit pomocniczy; zakres potencjałów:  $-0,4-0,6$  V; szybkość skanowania:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; w porównaniu z Ag/AgCl.

### 5.3.1. Testy funkcjonalne prototypu biosensora do wykrywania norowirusów

#### 5.3.1.1. Badanie liniowości i limitu detekcji, ocena selektywności

Po wytworzeniu stabilnej matrycy do detekcji norowirusa sprawdzono parametry użytkowe wytworzonego bioukładu w możliwościach oznaczania norowirusa. Pierwszym parametrem było zbadanie liniowości i limitu detekcji. Krzywa kalibracji (Ryc. 9b) oznacza dobrą liniowość w badanym zakresie, przy  $R^2 = 0,992$ . Najniższe stężenie wykryte przedstawioną metodą wyniosło  $-1 \times 10^{-18}$  TCID<sub>50</sub>.



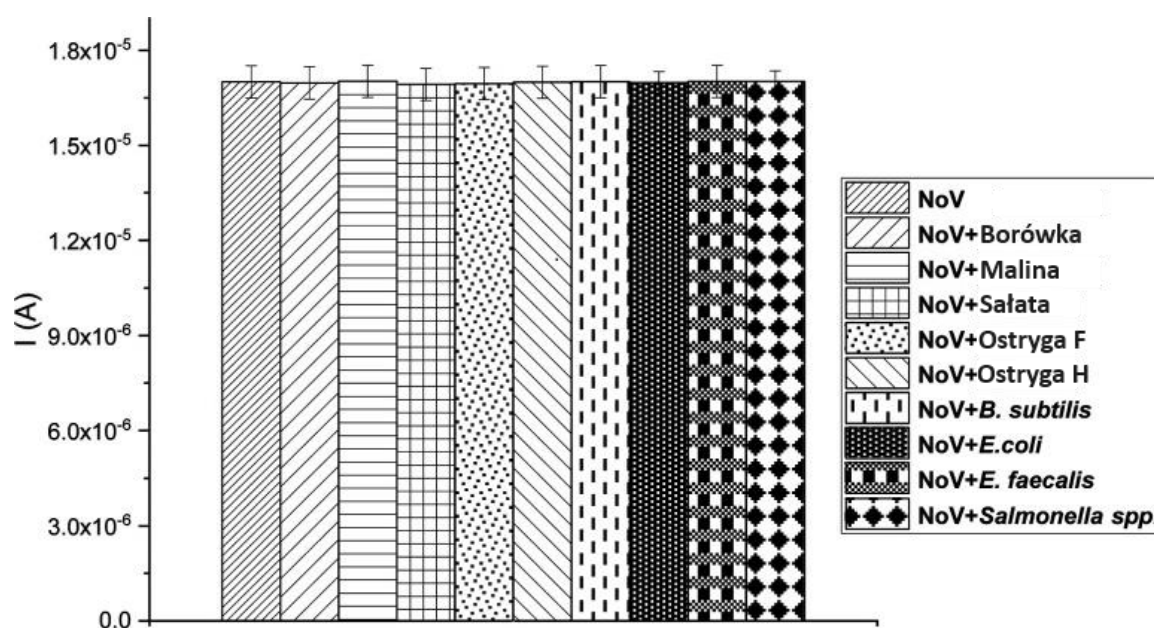
**Rycina 9.** Wykresy (a) DPV dla różnych rozcieńczeń NoV w potencjalnym zakresie 0,4-0,6 V w porównaniu z Ag/AgCl; (b) liniowa zależność między rozcieńczeniem bieżącym i NoV.

W celu wykluczenia fałszywie pozytywnych i negatywnych wyników – a więc oceny selektywności wytworzonego układu – przeprowadzono pomiary z próbkami żywności oraz bakteriami dającymi objawy zapalenia jelit i żołądka. Badania przeprowadzono przy pomocy próbek żywności takich jak: borówki (*Vaccinium L.*), sałaty (*Lactuca sativa L.*),



maliny (*Rubus idaeus* L.) i ostryg jadalnych (*Ostrea edulis*) z Francji i Holandii, zakupionych w sklepie Selgros (Mirków, Polska).

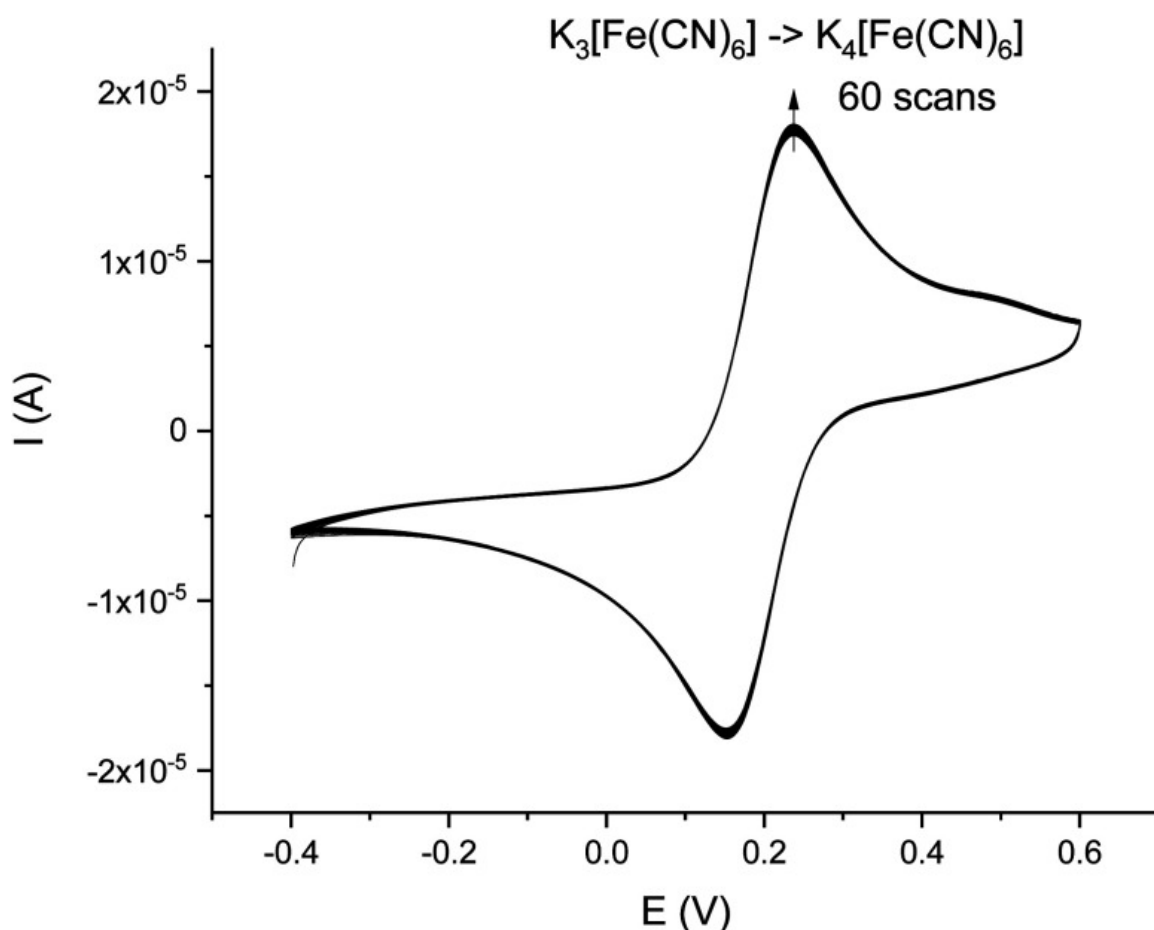
W trakcie badań selektywności porównano sygnał prądowy uzyskany z badanych próbek zmieszanych z NoV z uzyskaną wartością prądu dla  $1 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub>. Każda badana próbka wykazywała podobną wartość jak próbka z wirusem (Ryc. 10). Reakcja w badanym materiale różni się od NoV tylko 3%. Przedstawione wyniki wykazują, że proponowany immunoczuJNIK może być skutecznie stosowany do pomiaru norowirusa w projektach diagnostycznych i badaniach jakości żywności.



**Rycina 10.** Wyniki pomiarów próbek żywności i bakterii przy pomocy różnicowej voltametrii pulsowej (DPV).

### 5.3.1.2. Badania stabilności biosensora do wykrywania norowirusów

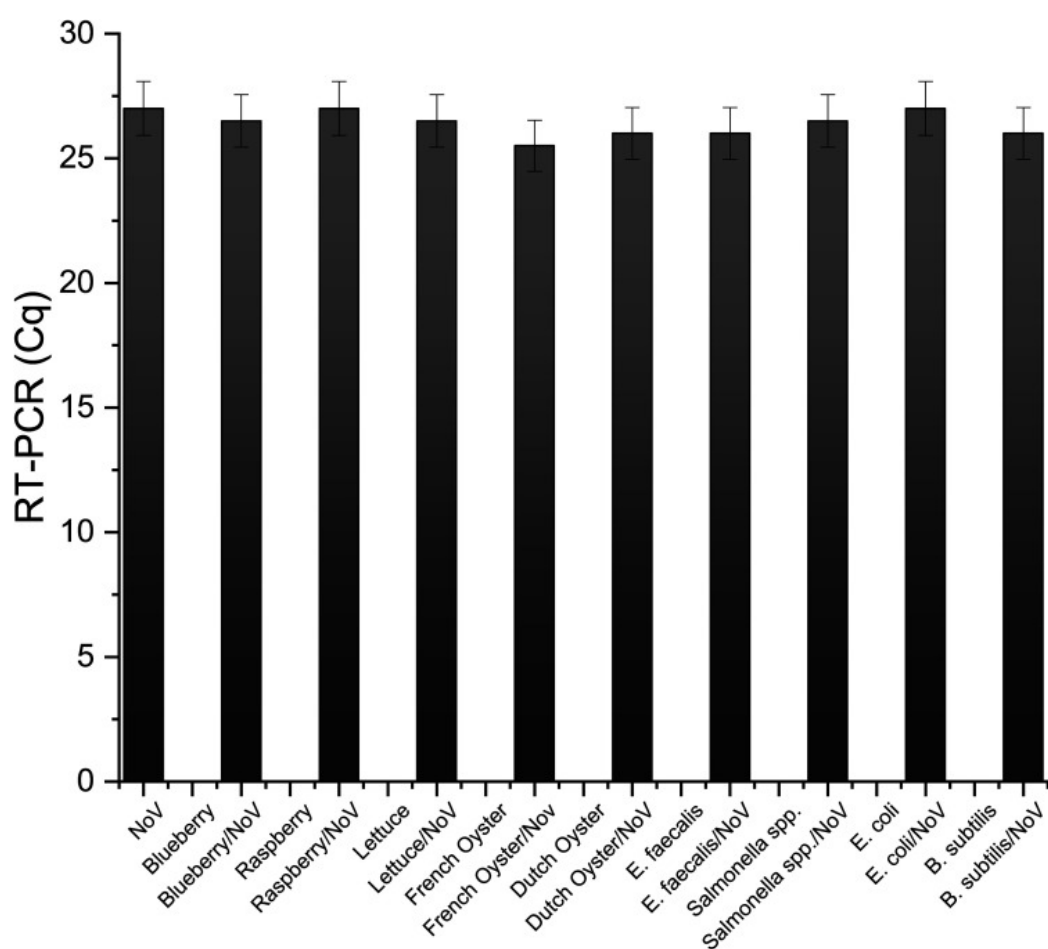
Czujnik przebadano pod kątem długoterminowej stabilności. Opracowany układ pomiarowy był stabilny przez minimum 2 tygodnie podczas przechowywania w 4 °C (100% wilgotności). Badanie wykonano przy zastosowaniu techniki CV (cyklicznej woltamperometrii). Zauważono zmianę średniego prądu elektrycznego z pierwotnym sygnałem tylko o 4% po okresie dwóch tygodni, co jest dobrym wynikiem (Ryc. 11).



**Rycina 11.** Skan cyklicznej woltamperometrii czujnika w obecności 5 mM Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>/Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> w 0,1 M KNO<sub>3</sub> po 2 tygodniach. Zakres potencjału: -0,4-0,6 V, szybkość skanowania 50 mV s<sup>-1</sup>, w porównaniu do elektrody Ag|AgCl, 60 cykli.

### 5.3.1.3. Porównanie wyników analiz genetycznych z pomiarami uzyskanymi z prototypu biosensora do wykrywania norowirusów

Złotym standardem diagnostyki norowirusów są testy RT-qPCR oraz RT-LAMP [123, 39]. Próbki użyte w badaniach zostały sprawdzone przy użyciu RT-qPCR. Wyniki uzyskane z pomiarów na czujniku były bardzo zbliżone do wyników RT-qPCR. Brak niezawodnego systemu hodowli tkankowej dla HuNoV doprowadził do powszechnego stosowania MNV w wielu badaniach [145]. Niemniej jednak RT-qPCR jest najczęściej stosowaną metodą diagnozowania zakażenia NoV. Analiza ta jest pracochłonna i wymaga wyspecjalizowanego personelu i sprzętu, dlatego też badane są inne, prostsze metody.



Rycina 12. Wyniki próbek żywności i bakterii z NoV i bez, zbadane przy pomocy RT-qPCR.

### **5.3.2. Prototyp czujnika szybkiego wykrywania norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych: Jednorazowy czujnik - test**

Prototyp czujnika do szybkiego wykrywania norowirusów oraz test przygotowanego czujnika szczegółowo opisano w Suplemencie (podrozdział: Jednorazowy czujnik – test).

#### **5.3.2.1 Wyniki RT-qPCR**

Przed przystąpieniem do badania na elektrodzie, każdy materiał poddano analizie testem RT-qPCR w celu potwierdzenia obecności norowirusa lub jego braku. Szczegółowe wyniki dla każdej próbki znajdują się w Tabeli SI zamieszczonej w Suplemencie.

#### **5.3.2.2. Pomiary kontroli pozytywnej i negatywnej na elektrodzie**

Test został zoptymalizowany wobec różnych typów próbek biologicznych i środowiskowych, aby potwierdzić jego skuteczność i wiarygodność.

Kontrola pozytywna:

- a. Próbki MNV hodowane na komórkach ustalonej linii makrofagów mysich-RAW 264.7
- b. Próbki HuNoV

Kontrola negatywna:

- a. Płyn z hodowli komórek RAW 264.7
- b. Płyn, w którym był zawieszony HuNoV
- c. Próbki żywności – sałaty lodowej, borówki amerykańskiej, maliny właściwej, krewetki tygrysiej oraz ostrygi pacyficznej
- d. Próbki bakterii – *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* oraz *Klebsiella pneumoniae*.

Próbki żywności i bakterii zmieszano z kontrolą pozytywną oraz z odpowiadającą im kontrolą negatywną. Każda próbka została mierzona w co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych i dziesięciu technicznych, aby zapewnić dokładność i wiarygodność wyników. Reprezentatywne wykresy dla każdej badanej grupy zamieszczono na Rycinach S8-S61 umieszczonych w Suplemencie.

Próbki pozytywne charakteryzowały się wzrostem impedancji na co najmniej 4 polach na elektrodzie. Wzrost ten był spowodowany połączeniem przeciwciała umieszczonego na

teście z norowirusem w próbce. Założeniem badania było sprawdzenie czy wszystkie próbki uznane za pozytywne, przy pomocy testu RT-qPCR, zostaną tak samo scharakteryzowane przez przygotowany układ pomiarowy.

Pierwszym etapem badań kontroli pozytywnej było zbadanie próbek MNV i HuNoV. Nałożony materiał badawczy wykazał wzrost impedancji (Suplement: Ryciny S8, S9).

Etap drugi kontroli pozytywnej obejmował zmieszanie próbek MNV oraz HuNoV z próbkami żywności, która jest potencjalnym nośnikiem materiału zakaźnego tj. – sałata lodowa, borówka amerykańska, malina właściwa, krewetka tygrysia oraz ostryga pacyficzna. Na Rycinach S10-S19 umieszczonych w Suplemencie widoczny jest wzrost impedancji po naniesieniu materiału badawczego, co stanowi oczekiwaną odpowiedź testu na dodane próbki.

W trzecim etapie badań kontroli pozytywnej, mieszało MNV, HuNoV z materiałem zakaźnym dającym podobne objawy jak infekcja norowirusowa tj. *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* oraz *Klebsiella pneumoniae*. Przebadany materiał wykazywał znaczny wzrost impedancji (Suplement: Ryc. S20-S29). Test zadziałał w sposób prawidłowy i wykazał zmianę wartości impedancji.

Kolejnym etapem badań były testy kontroli negatywnej, w celu potwierdzenia, że wzrosty impedancji są odpowiedzią na połączenie przeciwciał będących elementem testu z norowirusem. Jako pierwsze badano próbki płynu z hodowli komórek RAW 264.7. oraz płynu, w którym zawieszony był HuNoV. Nie zaobserwowano wzrostu impedancji (Suplement: Ryc. S30, S31)

W celu upewnienia się, że widoczna zmiana nie jest wynikiem dodania wyżej wymienionych materiałów badawczych, w drugim etapie zbadano próbki żywności, która jest potencjalnym nośnikiem materiału zakaźnego. Nie obserwowano wzrostów impedancji (Suplement: Ryc. S32-S36).

Trzeci etap testowania kontroli pozytywnej polegał na połączeniu etapu pierwszego (próbki płynu z hodowli komórek RAW 264.7. oraz płynu, w którym był zawieszony HuNoV) z próbkami żywności. Nie zaobserwowano wzrostów impedancji (Suplement: Ryc. S37-S44).

Czwarty etap obejmował badanie materiału zakaźnego, dającego podobne objawy jak infekcja norowirusowa. Pozwoliło to na wykluczenie fałszywie pozytywnych wyników, spowodowanych obecnością większej liczby patogenów. Na podstawie uzyskanych

rezultatów nie wykazano wzrostu impedancji po dodaniu bakterii (Suplement: Ryc. S45-S51).

Piątym etapem analizy kontroli negatywnej było połączenie etapu pierwszego z etapem czwartym. Zbadano czy zmieszanie płynu z nad hodowli komórek RAW 264.7. oraz płynu, w którym był zawieszony HuNoV z bakteriami da taki sam efekt jak pojedynczo. Podobnie jak poprzednio, nie zaobserwowano wzrostu impedancji (Suplement, Ryc. S52-S61).

### 5.3.2.3. Czulość i swoistość zwalidowanego testu

Na podstawie zebranych wyników obliczono czulość i swoistość testu. Jako pozytywny wynik kwalifikowano wyraźny wzrost impedancji na co najmniej 4 kanałach. W analizie uwzględniono 262 próbki pozytywne i 262 próbki negatywne. Czulość odnosi się do zdolności testu do wykrywania NoV i określa, ile próbek norowirusowych zostało poprawnie zidentyfikowanych. Czulość testu wyniosła 95%.

## 5.4. Wyniki działania przeciwwirusowego ekstraktów roślinnych parzonych na zimno i stężonych na zimno przeciwko norowirusowi mysiemu (MNV)

Aktywność wirusobójcza wahała się między 99,90% (dla oregano) a 99,99% (dla tymianku, pokrzywy, rozmarynu, imbiru, jeżówki, cynamonu i czosnku) (Tabele II i III).

**Tabela II.** Stężenia ekstraktów roślinnych użyte w badaniu cytotoksyczności oraz wyniki cytotoksyczności.

<b>Źródło ekstraktu roślinnego</b>	<b>Stężenie badanego ekstraktu (%)</b>	<b>Rozcieńczenie, które nie dawało efektu cytotoksyczności</b>
<i>Origanum vulgare</i> L. Liście oregano	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Coffea arabica</i> L. Kawa arabica w postaci palonych ziaren	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Cannabis sativa</i> L. Nasiona i liście konopi	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Thymus vulgaris</i> L. Liście tymianku pospolitego	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Urtica dioica</i> L. Liście pokrzywy zwyczajnej	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. Liście rozmarynu lekarskiego	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe Korzeń imbiru	18	10 <sup>-3</sup>

<i>Echinacea purpurea</i> L. Jeżówka purpurowa	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl Kora cynamonowca cejlońskiego	18	10 <sup>-3</sup>
<i>Allium sativum</i> L. Czosnek bulwiasty	18	10 <sup>-3</sup>
Eikatechina (EPI)	10	10 <sup>-2</sup>
Kwas kawoilochinowy (CQA)	10	10 <sup>-2</sup>

Całkowita zawartość fenoli w badanym materiale wynosiła od 105,7 mg GAE/100 ml (dla ekstraktu z oregano) do 9,2 mg GAE/100 ml (dla ekstraktu z czosnku). Najwyższą zawartość flawonoidów oznaczono w ekstrakcie z oregano (1217,94 mg CE/100 ml), a najniższą z czosnku (259,08 mg CE/100 ml). Najniższą zdolność antyoksydacyjną prezentowała kawa (451,15 µmol Trolox/100 ml), z kolei najwyższą, czosnek (844,72 µmol Trolox/100 ml). Szczegółowe wyniki zebrano w Tabeli III.

**Tabela III.** Działanie przeciwwirusowe ekstraktów roślinnych parzonych na zimno i stężonych na zimno przeciwko norowirusowi mysie (MNV) określone poprzez pomiar całkowitej zawartości fenoli (TPC), zawartości flawonoidów i zdolności przeciwutleniającej w ekstraktach roślinnych. Wyniki zaprezentowano za pomocą średniej  $\pm$  odchylenia standardowego; średnie wartości oznaczono literami a-e ( $p < 0,05$ ).

Źródło ekstraktu roślinnego	TPC (mg GAE /100 ml)	Flawonoidy (mg CE/100 ml)	Zdolność antyoksydacyjna (µmol Trolox/100 ml)	Aktywność wirusobójcza (%)
<i>Origanum vulgare</i> L. Liście oregano	105,73 <sup>a</sup> $\pm$ 1,57	1217,94 <sup>a</sup> $\pm$ 2,12	574,56 <sup>d</sup> $\pm$ 4,34	99,90
<i>Coffea arabica</i> L. Kawa arabica w postaci palonych ziaren	77,67 <sup>b</sup> $\pm$ 3,14	955,28 <sup>a</sup> $\pm$ 0,56	451,15 <sup>c</sup> $\pm$ 5,21	99,91
<i>Cannabis sativa</i> L. Nasiona i liście konopi	47,26 <sup>c</sup> $\pm$ 17,81	268,58 <sup>d</sup> $\pm$ 2,76	791,31 <sup>b</sup> $\pm$ 5,21	99,95
<i>Thymus vulgaris</i> L. Liście tymianku pospolitego	37,69 <sup>c</sup> $\pm$ 1,32	455,28 <sup>b</sup> $\pm$ 1,14	762,45 <sup>b</sup> $\pm$ 0,87	99,99
<i>Urtica dioica</i> L. Liście pokrzywy zwyczajnej	25,53 <sup>d</sup> $\pm$ 2,15	335,03 <sup>c</sup> $\pm$ 4,7	818,32 <sup>a</sup> $\pm$ 3,47	99,99

<i>Rosmarinus officinalis</i> L. Liście rozmarynu lekarskiego	24,83 <sup>d</sup> ± 3,14	357,18 <sup>c</sup> ± 7,01	807,27 <sup>a</sup> ± 5,21	99,99
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe Korzeń imbiru	24,13 <sup>d</sup> ± 2,81	293,89 <sup>d</sup> ± 2,94	798,67 <sup>a</sup> ± 3,49	99,99
<i>Echinacea purpurea</i> L. Jeżówka purpurowa	14,54 <sup>d</sup> ± 0,5	300,22 <sup>d</sup> ± 3,01	832,44 <sup>a</sup> ± 4,34	99,99
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl Kora cynamonowca cejlońskiego	9,63 <sup>e</sup> ± 0,33	271,74 <sup>d</sup> ± 5,56	842,88 <sup>a</sup> ± 6,95	99,99
<i>Allium sativum</i> L. Czosnek bulwiasty	9,11 <sup>e</sup> ± 0,16	259,08 <sup>d</sup> ± 2,54	844,72 <sup>a</sup> ± 6,09	99,99

mg CE/100 ml - zawartość flawonoidów wyrażona jako równoważne stężenie katechiny; mg GAE/100 ml - zawartość polifenoli wyrażona jako równoważne stężenie kwasu gallusowego; Trolox, kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy.



## 6. DYSKUSJA

Niniejsza, praca miała na celu zbadanie, w jaki sposób zakażenie MNV wpływa na stres oksydacyjny i zmiany histologiczne u myszy a także opracowanie prototypu biosensora do detekcji norowirusów w materiale biologicznym.

Powszechnie wiadomo, że zakażenie MNV wiąże się ze zmianami histopatologicznymi u gospodarzy immunokompetentnych, ale chorobie klinicznej zapobiega odpowiedź interferonowa zależna od przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1). W pracach innych autorów wykazano, że interferon gamma (interferon typu II), wraz z innymi interferonami typu I (m.in. interferon alfa, beta, kappa) i III (interferon lambda), odgrywa rolę w ograniczaniu infekcji makrofagów wirusem MNV. W badaniu Hsu i wsp. [146] myszy zakażone MNV analizowano pod kątem zmian histopatologicznych w różnych grupach, w tym myszy naturalnie zakażonych MNV; myszy typu dzikiego eksperymentalnie zakażonych MNV; myszy z niedoborem odporności eksperymentalnie zakażonych MNV; myszy w modelach chorób przewodu pokarmowego eksperymentalnie zakażonych MNV; oraz myszy w innych modelach chorób eksperymentalnie zakażonych MNV. Niektóre myszy naturalnie zakażone MNV wykazywały zmiany histopatologiczne w wątrobie, płucach, krezkowych węzłach chłonnych i śledzionie. U niektórych myszy typu dzikiego eksperymentalnie zakażonych MNV zmiany histopatologiczne wystąpiły w wątrobie, jelicie cienkim i śledzionie [146]. W badaniu histopatologicznym myszy z niedoborem odporności, eksperymentalnie zakażonych MNV zaobserwowano zmiany w wątrobie, płucach, jelicie cienkim i śledzionie, a w przypadku myszy Rag2<sup>-/-</sup>, /STAT1<sup>-/-</sup> i IfnαβγR<sup>-/-</sup> zaobserwowano zmiany w mózgu [146]. Niektóre myszy (myszy naturalnie zakażone MNV; myszy typu dzikiego eksperymentalnie zakażone MNV; myszy z niedoborem odporności eksperymentalnie zakażone MNV; myszy w modelach chorób żołądkowo-jelitowych eksperymentalnie zakażonych MNV; i myszy w innych modelach chorób eksperymentalnie zakażonych MNV) w modelach chorób przewodu pokarmowego eksperymentalnie zakażonych MNV wykazywały zmiany histopatologiczne w krezkowych węzłach chłonnych, jelicie cienkim i grubym, śledzionie i żołądku [146]. W przypadku szczepów B6.129P2 - Apoe<sup>tm1Unc</sup> /J i B6.129S7- Ldlr<sup>tm1her</sup> /J w modelu miażdżycowym eksperymentalnie zakażonych MNV zaobserwowano zmiany w aorcie [146]. W niniejszej pracy własnej nie stwierdzono poważnych zmian w badanych

narządach, z wyjątkiem łagodnych nacieków limfocytów w mózgu i wątrobie bez widocznego uszkodzenia komórek.

Infekcje wirusowe są jedną z najczęstszych przyczyn zakaźnego zapalenia mózgu [147]. Opisano kilka patogenów wywołujących ten stan, takich jak m.in. arbowirusy, rabdowirusy, enterowirusy, herpeswirusy, reowirusy, ortomyksowirusy, ortopneumowirusy i koronawirusy [148]. MNV, jak dotąd, nie był jednak traktowany jako czynnik neuropatogeny, co stoi w sprzeczności do wyników uzyskanych w przeprowadzonych przez nas eksperymentach. Niniejsze badania wykazały również, że poziom aktywności enzymatycznej i stężenie nieenzymatycznych markerów stresu oksydacyjnego różnią się i są zależne od rodzaju tkanki. Infekcja wirusowa spowodowała wyczerpanie i istotne zmniejszenie aktywności większości ocenianych enzymów, takich jak SOD, MnSOD, CAT i GR w tkance wątroby w porównaniu z myszami kontrolnymi, podczas gdy aktywności GPx i GST mierzone w tkance wątroby były znacznie wyższe u myszy zakażonych norowirusem. Dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i enzymy zależne od glutationu, takie jak GPx, są najważniejszymi enzymami antyoksydacyjnymi. Dysmutazy ponadtlenkowe, takie jak całkowity SOD i MnSOD, są enzymami, które katalizują konwersję rodnika nadtlenowego ( $O_2^-$ ) ponadtlenku do  $O_2$  i  $H_2O_2$ . Katalaza katalizuje konwersję  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i  $O_2$ , a GPx katalizują konwersję  $H_2O_2$  lub wodoronadtlenków do  $H_2O$  i alkoholi, jednocześnie utleniając GSH do GSSG. Rola reaktywnych form tlenu podczas infekcji wirusowych może być niejasna i może zależeć od sposobu ich wytwarzania [149]. Aktywność MnSOD była wyższa w tkance nerkowej myszy zakażonych norowirusem w porównaniu do myszy kontrolnych, z kolei aktywność GR była niższa we wszystkich badanych tkankach myszy zakażonych norowirusem, z wyjątkiem tkanki płucnej. Wiadomo, że aktywność i stężenie wybranych enzymów antyoksydacyjnych zmienia się podczas zakażenia norowirusem.

Ogólny stan równowagi pro- i antyoksydacyjnej organizmu ocenia się zazwyczaj na podstawie całkowitego statusu utleniającego (TOS), natomiast ogólny poziom przeciwutleniaczy w organizmie określa się na podstawie całkowitej zdolności przeciwutleniającej (TAC) [150]. Wybrane nieenzymatyczne parametry antyoksydacyjne/oksydacyjne takie jak TOS, TAC i MDA zmieniały się po zakażeniu norowirusem w zależności od analizowanej tkanki. Niemniej jednak infekcja norowirusem spowodowała zwiększenie poziomu TOS w mózgu i wątrobie oraz poziomów TAC w tkankach mózgu, podczas gdy poziomy TOS były znacznie obniżone w nerkach. Podobne

badania wykazały, że poziom TOS wyraźnie wzrasta wraz z zaostrzeniem choroby COVID-19, gdyż podwyższony poziom stresu oksydacyjnego ma zdolność nasilenia tej choroby. Karkhanei i wsp. [150]. podali, że poziom TOS w surowicy, jednego z biomarkerów stresu oksydacyjnego, był wyższy u pacjentów z ostrą postacią infekcji wywołanej SARS-Cov-2 [150]. Autorzy wykazali, że poziomy TOS w surowicy u zakażonych pacjentów z COVID-19 były powiązane z innymi ważnymi czynnikami, takimi jak gorączka, hospitalizacja dłuższa niż tydzień, miejsce zamieszkania, status edukacyjny i rodzaj pracy oraz pośredni związek ze SpO<sub>2</sub>. Zmniejszenie TAC może prowadzić do zmniejszenia odporności organizmu i ostatecznie do zwiększonej śmiertelności [150]. Przedstawione wyniki dowodzą, że markery stresu oksydacyjnego zmieniają się szybko w zależności od warunków środowiska zewnętrznego. Wybrane dowody sugerują, że nadprodukcja ROS i wyczerpanie układu antyoksydacyjnego odgrywają znaczącą rolę w patogenezie infekcji wirusowych i progresji choroby.

NoV są diagnozowane przy użyciu różnych metod, takich jak reakcja łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR), izotermiczna amplifikacja pętli (LAMP) i immunochromatografia (IC) [151- 155]. Dla potwierdzenia obecności NoV w próbce również można wykorzystać test immunoenzymatyczny (ELISA), Western Blot (WB) oraz mikroskopię elektronową [157,158]

Diagnostyka NoV techniką RT-PCR charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Technika ta potrafi wykryć nawet niewielkie ilości NoV w próbce, pozwala również na ocenę, z którą genogrupą mamy do czynienia. Jednak nie wszystkie szczepy można wykryć, co powoduje wynik fałszywie ujemny. RT-PCR można zastosować do diagnostyki różnych biologicznych próbek w tym kału, wymiocin wodą, żywności oraz powierzchni. Diagnostyka ta jest kosztową metodą i wymaga personelu posiadającego specjalistyczną wiedzę z zakresu biotechnologii [151]. Czas oczekiwania na wynik próbki kału w laboratoriach diagnostycznych wynosi 21 dni roboczych [152,153] przez co infekcja może zakończyć się przed odebraniem wyników [154].

Technika LAMP charakteryzuje się również wysoką czułością i specyficznością, jest szybsza, prostsza i tańsza niż RT-PCR, jednak nie jest dostępna we wszystkich laboratoriach [155]. Technika LAMP może być mniej dokładna niż RT-PCR. Mimo, że jest szybsza, tańsza i mniej skomplikowana w przeprowadzeniu, dalej wymaga personelu posiadającego wykształcenie biotechnologiczne oraz specjalistycznego sprzętu [151].

Diagnostyka NoV techniką immunochemiczną jest szybka, trwa około 15-30 minut, jednak często jest przeznaczona do użytku w laboratoriach co wydłuża czas oczekiwania do 1-3 dni (czas dla próbki kału [152]). Same testy są proste w użyciu, tanie (w stosunku do techniki RT-PCR) i są łatwe do interpretacji. Testy immunochemiczne są dostępne w różnych formatach, w tym jako testy kasetowe i testy paskowe, jednak charakteryzują się znacznie niższą czułością i specyficznością, niż testy RT-PCR. Testy immunochemiczne mogą też dawać fałszywie dodatnie wyniki, spowodowane reakcją krzyżową z innym patogenem, reakcje nieswoiste oraz obecność przeciwciał anti-NoV [156].

Test ELISA charakteryzuje się wysoką czułością, specyficznością oraz stosunkową łatwością wykonania (w porównaniu do techniki RT-PCR [156]). Możliwa jest automatyzacja procesu pozwalająca na zbadanie wielu próbek jednocześnie. Koszt wykonania jest relatywnie niski w stosunku do metod diagnostycznych, takich jak RT-PCR. Istnieje jednak ryzyko dodatnie fałszywych lub fałszywie ujemnych wyników. Próbki nieprawidłowo przechowywane lub nieprawidłowo przygotowane mogą wpłynąć na zafałszowanie wyniku [156]. Niektóre próbki mogą zawierać substancje krzyżowo reagujące lub zakłócające proces wiązania antygeny, co może wpływać na wyniki testów. Test ten może być przeprowadzony tylko przez osoby posiadające odpowiedni zakres wiedzy z dziedziny biotechnologii. Interpretacja wyników również wymaga doświadczenia laboratoryjnego. Testy nie są dostępne dla wszystkich genotypów NoV [156].

Technika Western Blot jest wysoce specyficzna, daje możliwość identyfikacji genotypów, jednak czułość tej techniki jest niższa niż RT-PCR. Jest czasochłonna, kosztowna i wymaga doświadczenia laboratoryjnego oraz specjalistycznego sprzętu [157].

Z kolei mikroskopia elektronowa, która jest wysoce czułą metodą pozwalającą na identyfikację NoV i odróżnienie go od innych wirusów powodujących podobne objawy. Jest stosunkowo szybką metodą i może dawać wyniki w ciągu kilku godzin, pozwala też na obserwację morfologii wirusa. Koszt mikroskopii elektronowej jest jednak dużo wyższy niż innych metod diagnostycznych wymienionych wyżej. Wymaga specjalistycznego sprzętu i doświadczonego personelu, a sama interpretacja jest czasochłonna i wymaga doświadczenia. Co więcej, charakteryzuje się niską swoistością - może dawać fałszywie dodatnie wyniki w przypadku innych wirusów o podobnej morfologii [158].

W związku z istniejącymi testami pozwalającymi na detekcję norowirusa, które nierzadko są długotrwałe, wymagają nakładów finansowych czy wykwalifikowanego personelu, alternatywę stanowią szybkie testy diagnostyczne. Opracowany w przedstawionych badaniach własnych test jest szybki - czas wykrywania z przygotowaniem próbki to około 20 minut. Obsługa testu jest prosta, nie wymaga specjalistycznego wykształcenia, a do zestawu dołączona jest instrukcja, która prowadzi użytkownika krok po kroku jak przygotować próbkę i jak wykonać test. W przygotowanym zestawie znajduje się każdy wymagany element, potrzebny do jego prawidłowego przeprowadzenia, co pozwala na wykonanie testu w warunkach domowych. Może on być używany również w zakładach produkcji, przetwórstwa żywności, farmach owoców morza, polach upraw, w sklepach oraz restauracjach. Jest wykonany z materiałów nadających się do recyklingu. Ponadto, ostateczna wersja testu będzie składała się z dwóch części: pierwsza (wielokrotnego użytku) zawiera laptop, czytnik Aquanostic Reader, statyw, pęsetę, nożyczki, tackę oraz kabel USB C. Druga, która jest przeznaczona do jednorazowego użytku zawiera 10 testów, skalpel, bufor pomiarowy, sitka molekularne. Czulość testu wynosi 95% a swoistość 91,6%. Spośród wszystkich wymienionych obecnie dostępnych możliwości identyfikacji próbki, opracowana procedura diagnostyczna pozwalająca na stwierdzenie obecności norowirusa w badanym materiale, wydaje się najbardziej korzystną opcją. Wytworzony układ pomiarowy charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Urządzenie do szybkiej detekcji norowirusów może znaleźć zastosowanie w wielu sektorach przemysłu jak i w użytku domowym. Obecnie przygotowany, funkcjonalny test został skomercjalizowany i wdrożony do gamy produktów Fish Farm Solutions, korzystając wyżej wymienionego testu diagnostycznego, hodowcy ryb i krewetek mogą szybko i z dużą dokładnością wykryć potencjalne zagrożenie epidemiczne norowirusami. Dzięki temu mogą podjąć świadome decyzje, wpływając na dobrostan zwierząt hodowlanych, zwiększając tym samym wydajność ekonomiczną hodowli. W niniejszej pracy oceniano zdolności wirusobójczych i przeciwutleniających ekstraktów roślinnych, takich jak oregano (*Origanum vulgare* L.), kawa (*Coffea arabica* L.), konopie (*Cannabis sativa* L.), tymianek (*Thymus vulgaris* L.), pokrzywa (*Urtica dioica* L.), rozmaryn (*Rosmarinus officinalis* L.), imbir (*Zingiber officinale* Roscoe), jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea* L.), cynamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) i czosnek (*Allium sativum* L.), przygotowanych zgodnie z techniką zaparzania i zagęszczania na zimno. Zbadano ich właściwości przeciwwirusowe oraz zawartość związków fenolowych, flawonoidów i

aktywność przeciwutleniająca, w celu potencjalnego zastosowania jako dodatku do konwencjonalnego leczenia objawowego w infekcjach norowirusowych.

Obecnie infekcje NoV leczone są tylko objawowo, nie opracowano skutecznych preparatów antywirusowych ani szczepionki. Od dawna natomiast w terapii zakażeń wirusowych wykorzystuje się medycynę naturalną, stanowiącą bezpieczną alternatywę dla leków wirusobójczych. Naturalne preparaty często swoją skuteczność zawdzięczają związkom fenolowym [159], które wykazują właściwości wirusobójcze, immunomodulujące i przeciwzapalne [160]. Polifenole zapobiegają przyłączaniu się wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1) do glikoprotein komórek gospodarza i tworzeniu fuzji, zapobiegając w ten sposób rozprzestrzenianiu się wirusa między komórkami organizmu [160]. Według Diaza i wsp. [161] istnieje korelacja między właściwościami przeciwutleniającymi i przeciwzapalnymi roślin leczniczych a zawartością składników fenolowych i flawonoidowych. Sugeruje to, że rośliny dezaktywują wolne rodniki poprzez łączenie się z innymi cząsteczkami (poprzez parowanie elektronów). W związku z tym wykazano efekty biologiczne, które promują zdrowie, takie jak korzyści neuroprotektcyjne lub zastosowanie w leczeniu chorób niezakaźnych.

Badane ekstrakty roślinne przygotowano przy pomocy nowej technologii ekstrakcji na zimno. Zaobserwowano, że wyższa wartość całkowitej zawartości związków fenolowych (TPC) wiąże się z niższą skutecznością przeciwutleniającą i przeciwwirusową, co stoi w opozycji do badań innych autorów [162]. W badaniach Sida i wsp. [163] oraz Ziarno i wsp. [164] stwierdzono brak korelacji między całkowitą zawartością związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą badanego materiału roślinnego. Dotychczas przebadano skuteczność fenoli wobec kilku wirusów. Flawonoidy pozyskane z *Scutellaria baicalensis* L. wykazywały aktywność wobec SARS-CoV-2 [165], z kolei polifenole z zielonej herbaty i wina wykazywały właściwości wirusobójcze przeciw wirusowi Zachodniego Nilu, zika i dengi [166]. Z badań Tsai i wsp. [167] wynika, że specyficzny mechanizm działania polifenoli przeciwko norowirusom polega na zakłócaniu syntezy białek i aktywowaniu szlaków odpowiedzi przeciwwirusowej komórek gospodarza. Polifenole zmieniają przepuszczalność jelit, mają właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające, co w sposób pośredni zapobiega przed infekcjami NoV [168]. Ponadto, związki fenolowe przeciwdziałają stanom zapalnym, cukrzycy oraz nowotworom [169].

W badaniach własnych testowano dostępne i powszechnie stosowane ekstrakty wodne z roślin stosowanych do różnych celów leczniczych. Oregano używane jest przy problemach żołądkowych, wykrztuśnych, oddechowych, przy schorzeniach układu oddechowego i trawiennego oraz na rany, przy bólach głowy i depresji [170]. Asensio i wsp. ocenili aktywność antyoksydacyjną olejku eterycznego czterech różnych rodzajów oregano (*O. x majoricum*, *O. vulgare* ssp. i *Hirtum* ssp.) z centralnych i południowych regionów Argentyny. Uzyskane wyniki wahały się od 0,234 do 0,163 mM (26,569 -54,82  $\mu\text{mol}$  Trolox/100 ml) Trolox/mg olejku eterycznego [171] co jest ponad dziesięciokrotnie niższą wartością w porównaniu do wyników własnych (574,56  $\mu\text{mol}$  Trolox/100 ml), może się to jednak wiązać z tym, że w badaniach Asensio wykorzystywano olejki eteryczne, a nie wyciągi roślinne.

Wyciąg z kawy, kolejna badana w projekcie substancja, jest stosowana na Haiti w przypadkach anemii, obrzęków i osłabienia, w Nikaragui jako środek przeciwgorączkowy [106, 107] a w Etiopii w leczeniu zapalenia żołądka i jelit, którym towarzyszy biegunka [108]. Metoda palenia kawy degraduje fitochemikalia i zmniejsza aktywność enzymów antyoksydacyjnych, przez co porównanie aktywności biologicznej kawy jest trudne [109]. Sukoco i wsp. [110] badali potencjał antyoksydacyjny kawy bezkofeinowej i kofeinowej oraz imbiru. Kawa bezkofeinowa miała wyjściową aktywność antyoksydacyjną na poziomie 17 mmol/100 ml, podczas gdy kawa kofeinowa - 40 mmol/100 ml. Dodanie 10% imbiru zwiększyło odczyty odpowiednio o 2 i 1 mmol/100 ml. Wyciąg z nasion i liści konopi stosuje się w Chinach w leczeniu schorzeń jamy ustnej i zębów [111]. Jest używany również w przypadku wielu dolegliwości takich jak tężyczka, drgawki, dna moczanowa, malaria, bezsenność, duszność, kaszel, ból głowy, nieregularne miesiączki, świąd i niedokrwistość [112]. Smeriglio i wsp. [113] określili zdolność przeciwutleniającą *Cannabis sativa* na 695  $\mu\text{mol}$  Trolox/100 ml, czyli nieco niższą niż w przeprowadzonych w ramach projektu. Jednak ekstrakty z liści odmian *Cannabis sativa* wykazały właściwości bakteriobójcze w stężeniach poniżej 100  $\mu\text{mol}$ /100 ml, więc różnica ta wydaje się być nieistotna [114]. Można natomiast spodziewać się, że zwiększona koncentracja, przyniesie lepsze wyniki. Biorąc pod uwagę 99,95% poziom wirusobójczości, Suplementacja *Cannabis sativa* może być korzystna w leczeniu biegunki wirusowej.

Tymianek stosowany jest w przypadku leczenia krztuśca, zapalenia oskrzeli, astmy infekcji jamy ustnej żołądka, jelit i dróg oddechowych i wzmocnienia pracy serca [115, 116]. Według Gahrue i wsp. [117] tymianek ekstrahowany etanolem zawierał 1602

$\mu\text{mol}/100\text{ g}$  przeciwutleniaczy, podczas gdy próbka wodna tylko  $89\ \mu\text{mol}/100\text{ g}$ . Nasze badanie wykazało podobne wyniki, przy czym ekstrakt z tymianku parzony na zimno miał nieco mniej przeciwutleniaczy.

Wyciąg z rozmarynu jest stosowany w leczeniu bólu głowy, brzucha, bolesnych miesiączek, epilepsji, bólu reumatycznego, skurczy, pobudzenia nerwowego, ataków hysterii i depresji oraz osłabienia pamięci. Aktywność przeciwutleniającą ekstraktu z tej rośliny badano przy użyciu trzech technik (ABTS, DPPH, FRAP). Wyniki wyniosły odpowiednio  $38,7$ ,  $513$  i  $662\ \mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$  [118]. W badaniu innych autorów stwierdzono zdolność przeciwutleniającą wyciągów uzyskanych po zastosowaniu różnych metod ekstrakcji:  $1270\ \mu\text{mol}/100\text{ ml}$  (Soxhlet),  $910\ \mu\text{mol}/100\text{ ml}$  (maceracja) i  $810\ \mu\text{mol}/100\text{ ml}$  (ultradźwięki) [119]. Wynik analizy przeprowadzonej w naszym laboratorium wyniósł  $807\ \mu\text{mol}/100\text{ ml}$ , co sugeruje, że metoda ekstrakcji na zimno ma porównywalną do innych metod bioaktywną zdolność przeciwutleniającą, co czyni ją opłacalną w produkcji na masową skalę.

Pokrzywa wykazuje właściwości moczopędne, ściągające oraz regulujące cykl miesięczkowy. Stosowana jest w leczeniu kaszlu, przeziębienia, astmy i żółtaczki, biegunki, zapalenia żołądka i jelit, reumatyzmu, czerwonki, epilepsji, skaleczeń, oparzeń, na rany, czyraki oraz pęcherze [120-122]. Różne techniki ekstrakcji *Urtica dioica* L. wpływają na właściwości przeciwutleniające. Kószegi i wsp. [122] przetestowali wodne ekstrakty z pokrzywy i stwierdzili, że po użyciu wrzącej wody i parzeniu w temperaturze  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez trzy godziny, miały one wysoki poziom przeciwutleniaczy (odpowiednio  $210$  i  $268\ \mu\text{mol}$ ), podczas gdy  $70\%$  EtOH dawał jeszcze wyższe wartości -  $310\ \mu\text{mol}$  i więcej. Suszenie konwekcyjne może jednak zmieniać aktywność ze względu na utratę składników bioaktywnych. Pomimo tego osiągnięto maksymalną aktywność przeciwwirusową, z wynikiem aktywności przeciwutleniającej wynoszącej  $818\ \mu\text{mol Trolox}/100\text{ ml}$ .

Imbir stosowany jest w leczeniu kaszlu, astmy, niestrawności, utraty smaku i apetytu, wzdęć, nudności, wymiotów, reakcji alergicznej, przeziębienia, gorączki, problemów z układem oddechowym, bólami głowy, mięśni, oraz dolegliwościami jamy ustnej [123]. Wspiera również układ trawienny [124]. Nasze badania wykazały silne właściwości wirusobójcze ( $99,99\%$ ) przeciwutleniające ( $7986,67\ \mu\text{mol}/100\text{ ml}$ ) imbiru, co sugeruje, że może on zwiększać skuteczność leków i suplementów.



Kolejną testowaną substancją była jeżówka purpurowa której używa się w medycynie naturalnej do leczenia ran i zakażeń infekcji dróg oddechowych zarówno u ludzi, jak i u zwierząt [125]. *Echinacea purpurea* wykazuje silne działanie przeciwutleniające porównywalne do czosnku, a ze względu na brak specyficznego zapachu i smaku jest preferowana przez konsumentów. Dzięki optymalizacji warunków ekstrakcji może służyć jako punkt odniesienia dla procesów ekstrakcji termalnej i jako bezpieczne źródło związków fenolowych.

Cynamon wykazuje działanie przeciwwymiotne, przeciwbiegunkowe i przeciwwzdęciowe [126]. Stosowany jest przy nadciśnieniu, przeziębieniu, malarii, kaszlu, gruźlicy płuc, chorób przenoszonych drogą płciową oraz jako środek przeciwkrzepliwy. Dvorackova i wsp. [127] przeanalizowała aktywność przeciwutleniaczy zawartych w wyciągach z tej rośliny przy użyciu ultradźwięków i w porównaniu do naszych badań, odnotowała wyższe wartości – 268  $\mu\text{mol/g}$ .

Ekstrakt z czosnku wykazywał najniższą z badanych roślin zawartość TPC i flawonoidów, ale najwyższą zdolność przeciwutleniającą i działanie wirusobójcze. Był też najbardziej skutecznym ekstraktem bioaktywnych składników o właściwościach przeciwutleniających w warunkach nietermicznych. Powszechnie używa się go w Suplementacji leczenia nadciśnienia, przeziębienia, malarii, kaszlu, gruźlicy płuc, chorób przenoszonych drogą płciową, zaburzeń psychicznych, chorób nerek i wątroby, astmy i cukrzycy. Obniża on ciśnienie krwi, poziom cholesterolu i glukozy [128,129].

Wielu autorów przeprowadzało badania antynorowirusowych właściwości oregano, tymianku, pokrzywy, rozmarynu, imbiru i cynamonu [116-121]. Pomijając różne techniki ekstrakcji substancji otrzymano redukcję NoV na poziomach od 1,07 log (oregano) do 4 log (pokrzywa) [119]. Należy jednak pamiętać, że wszystkie badania, włączając w to nasze, bazowały na testach *in vitro*, ograniczając ich znaczenie dla modeli ludzkich lub zwierzęcych.

Badania innych autorów wykazały obniżenie poziomu wirusa, przy czym wyciągi z pokrzywy wydają się najbardziej skuteczne, z kolei z oregano wykazywały najslabsze działanie. Na podstawie badań własnych można stwierdzić, że ekstrakt z kawy arabica miał znaczący wpływ wirusobójczy na NoV, w przeciwieństwie do ustaleń innych badaczy [172,173]. Szeroki zakres substancji chemicznych, które mogą reagować z odczynnikiem F-C, może wyjaśniać, dlaczego nasze badania różnią się od innych badań nad związkami

polifenolowymi. Wysoka zawartość cukru i melanoidów w kawie może zmieniać zdolność zmiatania rodnika kationowego ABTS (2,2-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu), przyczyniając się do tej rozbieżności [174]. Nasze wyniki są za to zgodne z opublikowanymi w innych pracach badaniami nad ekstraktami z tymianku i imbiru, w których również stwierdzono podobne stężenia związków fenolowych (TPC). Wysoka ilość 260 mg GAE/100 ml w ekstraktach z cynamonu może wynikać ze stosunku ziół do wody [175].

Podsumowując, przyjmowanie ekstraktów z badanych roślin podczas leczenia biegunki wirusowej może potencjalnie złagodzić objawy lub skrócić czas trwania choroby.

## 7. WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Infekcja norowirusowa nie wpłynęła znacząco na zmiany histopatologiczne w tkankach jelita cienkiego i grubego, trzustki, wątroby, serca, płuc, nerek, fragmentów mózgu (przodomózgowie, śródmózgowie) u badanych zwierząt, myszy szczepu C56B1/6J w porównaniu do grupy kontrolnej.

Infekcja norowirusowa wpływa na poziom stresu oksydacyjnego zwierzęcia modelowego, myszy szczepu C56B1/6J redukując aktywność większości badanych enzymów antyoksydacyjnych. Odpowiedź układu antyoksydacyjnego, mierzonego enzymatycznymi i nieenzymatycznymi markerami antyoksydacyjnymi na infekcję wirusową jest zależna od tkanki. W większości badanych tkanek, najwrażliwsze na zakażenie okazały się markery enzymatyczne, gdzie infekcja wirusowa spowodowała obniżenie aktywności enzymatycznej większości enzymów antyoksydacyjnych u myszy szczepu C56B1/6J w porównaniu do grupy kontrolnej. Infekcja norowirusem wpłynęła na układ pro- i antyoksydacyjny obniżając całkowitą pojemność antyoksydacyjną oraz zwiększając całkowity status oksydacyjny w większości badanych tkanek myszy szczepu C56B1/6J w porównaniu do grupy kontrolnej.

2. Opracowano prototyp sprzętu diagnostycznego w postaci szybkich testów antygenowych do detekcji norowirusów. Przeanalizowano próbki pozytywne (próbki MNV namnażane na komórkach ustalonej linii makrofagów mysich RAW 264.7., próbki HuNoV zmieszane z próbkami żywności - sałaty lodowej, borówki amerykańskiej, maliny właściwej, krewetki tygryskiej oraz ostrygi pacyficznej oraz bakteriami – *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* oraz *Klebsiella pneumoniae*) oraz materiał negatywny (płyn z hodowli komórek RAW 264.7., oraz płyn, w którym zawieszony był HuNoV, próbki żywności – sałaty lodowej, borówki amerykańskiej, maliny właściwej, krewetki tygryskiej oraz ostrygi pacyficznej, próbki bakterii - *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* i *Klebsiella pneumoniae* oraz próbki żywności zmieszane z płynem z hodowli komórek RAW 264.7. i płynem, w którym był zawieszony HuNoV). Otrzymane wyniki świadczą o oczekiwanym działaniu testu.

3. Ekstrakty z powszechnie dostępnych roślin (oregano (*Origanum vulgare* L.), kawa (*Coffea arabica* L.), konopie siewne (*Cannabis sativa* L.), tymianek (*Thymus vulgaris* L.), pokrzywa (*Urtica dioica* L.), rozmaryn (*Rosmarinus officinalis* L.), imbir (*Zingiber officinale* Roscoe), jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea* L.), cynamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) i czosnek (*Allium sativum* L.) wykazują właściwości wirusobójcze wobec norowirusów i dzięki temu, prawdopodobnie mogą być przydatne w leczeniu uzupełniającym i łagodzeniu objawów wywołanych infekcją norowirusami. Dodatkowym atutem wyżej wymienionych ekstraktów, jest ich wysoki potencjał antyoksydacyjny.

## 8. STRESZCZENIE

Jednym z głównych czynników wywołujących wirusowe zapalenie żołądka i jelit u dorosłych i dzieci na całym świecie są norowirusy (NoV). Każdego roku powodują one 210 000 zgonów i 685 milionów zachorowań. W Stanach Zjednoczonych koszty ekonomiczne związane z infekcjami NoV wynoszą łącznie 4,2 mld USD, podczas gdy straty społeczno-ekonomiczne szacuje się na 60,3 mld USD. Uważa się, że przed ukończeniem drugiego roku życia, każde dziecko przeszło co najmniej jedną chorobę wywołaną przez norowirusy. Ogniska tego patogenu zwykle występują w miejscach o dużej gęstości zaludnienia, takich jak szpitale, domy opieki, szkoły, przedszkola, sale zabaw dla dzieci, obiekty wojskowe i statki wycieczkowe. Głównym źródłem przenoszenia HuNoV jest żywność, woda i powierzchnie zanieczyszczone wymiocinami lub kałem.

W celu określenia wpływu norowirusa na organizm człowieka przeprowadzono badania na modelu zwierzęcym - myszach C56B1/6J. Badano zmiany histopatologiczne i stres oksydacyjny, w organach takich jak mózg, mózdzek, wątroba płuca i nerki. Zmiany histopatologiczne zauważono w mózgu, mózdzku i wątrobie u wszystkich osobników, w płucach i nerkach zaobserwowano zmiany u części osobników. Badania te sugerują, że zakażenie MNV może powodować znaczące zmiany w parametrach w wielu różnych narządach. Tkanki nerek myszy zakażonych MNV wykazywały zwiększoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej Mn, podczas gdy tkanki wątroby wykazywały zmniejszoną aktywność reduktazy glutationowej, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej Mn i dysmutazy ponadtlenkowej. Z wyjątkiem tkanki płucnej, wszystkie badane tkanki myszy zakażonych MNV miały obniżoną aktywność reduktazy glutationowej. Badanie to wykazało również, że podczas gdy poziomy całkowitej pojemności oksydacyjnej były znacznie obniżone w nerkach, zakażenie norowirusem spowodowało podwyższone poziomy całkowitej zdolności antyoksydacyjnej i całkowitej pojemności oksydacyjnej w mózgu i wątrobie. Źródłem tych zmian przypuszczalnie są reaktywne formy tlenu wytwarzane przez infekcję wirusową. Mogą one powodować stres oksydacyjny i uszkadzać komórki. Odkrycia te pozwalają spojrzeć na norowirusa jako patogen, który odpowiada nie tylko za uszkodzenia układu pokarmowego, ale też mózgu. Obecnie infekcje norowirusowe są potwierdzane przy pomocy testów RT-PCR - jest to złoty standard diagnostyki. Ze względu na krótki czas infekcji - 2-3 dni, wynik potwierdzający infekcję norowirusa lub zanieczyszczenie produktów spożywczych i wody, często jest otrzymywany za późno. Wczesna diagnostyka

infekcja jest kluczowa dla ograniczenia epidemii norowirusowych. Stworzony przeze mnie test jest szybki - czas wykrywania z przygotowaniem próbki to około 20 minut. Obsługa testu jest prosta, nie wymaga specjalistycznego wykształcenia. W przygotowanym zestawie do testu znajdować się będzie każdy wymagany element do prawidłowego przeprowadzenia testu. Zbadanie próbki będzie możliwe również w warunkach domowych. Test będzie przeznaczony do użytku zarówno profesjonalnego, jak i nieprofesjonalnego. Zestaw może być używany na farmach owoców morza, polach upraw, w firmach przetwórczych, sklepach, restauracjach oraz w placówkach ochrony zdrowia. Czulość testu wynosi 95%, a swoistość 91,6%. Spośród wszystkich wymienionych obecnie dostępnych możliwości identyfikacji próbki, stworzone przeze mnie rozwiązanie wydaje się najbardziej korzystną opcją.

Do dzisiaj nie opracowano szczepionki przeciw norowirusom, a leczenie jest tylko objawowe. W celu wsparcia leczenia przetestowano 10 roślinnych ekstraktów: oregano (*Origanum vulgare* L.), kawa (*Coffea arabica* L.), konopie (*Cannabis sativa* L.), tymianek (*Thymus vulgaris* L.), pokrzywa (*Urtica dioica* L.), rozmaryn (*Rosmarinus officinalis* L.), imbir (*Zingiber officinale* Roscoe), jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea* L.) i czosnek (*Allium sativum* L.), cynamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) i czosnek (*Allium sativum* L.). Aktywność wirusobójcza dla wszystkich ekstraktów wynosiła co najmniej 99,90%. W eksperymencie porównano całkowitą zawartość polifenoli, aktywność wirusobójczą i zdolność przeciwutleniającą: im wyższa zawartość polifenoli, tym niższy efekt wirusobójczy i zdolność przeciwutleniająca. Suplementacja naturalnymi ekstraktami roślinnymi podczas infekcji norowirusowych może być korzystna ze względu na wysoką zdolność antyoksydacyjną, może mieć wysoce pożądane działanie wirusobójcze i terapeutyczne.

## 9. SUMMARY

One of the main causative agents of viral gastroenteritis in adults and children worldwide are noroviruses (NoVs). They cause 210,000 deaths and 685 million cases each year. In the US, the economic cost of NoV infections totals US\$4.2 billion, while the socioeconomic loss is estimated at US\$60.3 billion. It is believed that by the age of two, every child has undergone at least one illness caused by norovirus. Outbreaks of this pathogen usually occur in high-density settings such as hospitals, nursing homes, schools, kindergartens, children's playrooms, military facilities and cruise ships. The main sources of HuNoV transmission are food, water and surfaces contaminated with vomit or faeces.

In order to determine the impact of norovirus on the human body, studies were carried out on an animal model - C56B1/6J mice. Histopathological changes and oxidative stress were studied, in organs such as brain, cerebellum, liver, lung and kidney. Histopathological changes were noted in the brain, cerebellum and liver in all individuals; changes were observed in the lungs and kidneys in some individuals. These studies suggest that MNV infection can cause significant changes in parameters in many different organs. Kidney tissues from MNV-infected mice showed increased superoxide dismutase Mn activity, while liver tissues showed decreased glutathione reductase, catalase, superoxide dismutase Mn and superoxide dismutase activity. With the exception of lung tissue, all tissues of MNV-infected mice tested had reduced glutathione reductase activity. This study also showed that while levels of total oxidative capacity were significantly reduced in the kidney, norovirus infection resulted in elevated levels of total antioxidant capacity and total oxidative capacity in the brain and liver. The source of these changes presumably lies in the reactive oxygen species produced by the viral infection. These can cause oxidative stress and damage cells. These findings allow us to look at norovirus as a pathogen that is responsible not only for damage to the digestive system, but also to the brain. Currently, norovirus infections are confirmed using RT-PCR tests - the gold standard for diagnosis. Due to the short time of infection - 2-3 days, the result confirming norovirus infection or contamination of food products and water, is often obtained too late. Early diagnosis of infection is key to reducing norovirus outbreaks. The test I have developed is rapid - detection time with sample preparation is about 20 minutes. Operation of the test is simple, requiring no specialist training. The prepared test kit will contain every item required to perform the test correctly. Testing of the sample will also be possible at home. The test will be suitable for both professional and non-professional use. The kit can be used on

seafood farms, crop fields, processing companies, shops, restaurants and health care facilities. The test has a sensitivity of 95% and a specificity of 91.6%. Of all the currently available sample identification options listed, the solution I have created appears to be the most favourable option.

To support the treatment, 10 plant extracts were tested: oregano (*Origanum vulgare* L.), coffee (*Coffea arabica* L.), hemp (*Cannabis sativa* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), nettle (*Urtica dioica* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) and garlic (*Allium sativum* L.), cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) and garlic (*Allium sativum* L.). The virucidal activity for all extracts was at least 99.90%. The experiment compared the total polyphenol content virucidal activity and antioxidant capacity: the higher the polyphenol content, the lower the virucidal effect and antioxidant capacity. Supplementation with natural plant extracts during norovirus infections maybe beneficial due to their high antioxidant capacity, and may have highly desirable virucidal and therapeutic effects.



## 10. BIBLIOGRAFIA

- [1] Cannon, J.L.; Bonifacio, J.; Bucardo, F.; Buesa, J.; Bruggink, L.; Chan, M.C.; Fumian, T.M.; Giri, S.; Gonzalez, M.D.; Hewitt, J.; Lin, J.H.; Mans, J.; Muñoz, C.; Pan, C.Y.; Pang, X.L.; Pietsch, C.; Rahman, M.; Sakon, N.; Selvarangan, R.; Browne, H.; Barclay, L.; Vinjé, J. Global Trends in Norovirus Genotype Distribution among Children with Acute Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* **2021.** 21;11(2):e0485722.
- [2] Ahmed, S.M.; Hall, A.J.; Robinson, A.E.; Verhoef, L.; Premkumar, P.; Parashar, U.D.; Koopmans, M.; Lopman, B.A. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* **2014.** 14(8):725-730.
- [3] Bartsch, S.M.; Lopman, B.A.; Ozawa, S.; Hall, A.J.; Lee, B.Y. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS One.* **2016.** 26;11(4):e0151219.
- [4] Cannon, J.L.; Lopman, B.A.; Payne, D.C.; Vinjé, J. Birth Cohort Studies Assessing Norovirus Infection and Immunity in Young Children: A Review. *Clin Infect Dis.* **2021.** 2;69(2):357-365.
- [5] Bucardo, F.; Nordgren, J.; Carlsson, B.; Kindberg, E.; Paniagua, M.; Möllby, R.; Svensson, L. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. *Pediatr Infect Dis J.* **2010.** 29(10):934-9.
- [6] García, C.; DuPont, H.L.; Long, K.Z.; Santos, J.I.; Ko, G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol.* **2006.** 44(8): 2997–3000.
- [7] Marques Mendanha de Oliveira, D.; Souza, M.; Souza, F.F.; César Pereira Santos, H.; das Dôres de Paula Cardoso D. Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol.* **2014.** 86(9):1569-75.
- [8] Huynen, P.; Mauroy, A.; Martin, C.; Savadogo, L.G.; Boreux, R.; Thiry, E.; Melin, P.; De Mol, P. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol.* **2013.** 58(3):515-21
- [9] Tseng, H.F.; Sy, L.S.; Ackerson, B.; Solano, Z.; Slezak, J.; Luo, Y.; Fischetti, C.A.; Shinde, V. Severe Morbidity and Short- and Mid- to Long-term Mortality in Older

- Adults Hospitalized with Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Infect Dis.* **2020.** 14;222(8):1298-1310.
- [10] Phillips, G.; Tam, C.C.; Rodrigues, L.C.; Lopman, B. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol Infect.* **2010.** 138(10):1454-8.
- [11] Robilotti, E.; Deresinski, S; Pinsky, B.A. Norovirus. *Clin Microbiol Rev.* **2015.** 28(1):134-64.
- [12] Robert, O.; Cannon, J.R.; Poliner, R.B.; Hirschhorn, D.C.; Rodeheaver, P.R. Silverman, E.A.; Brown, G.H., Talbot, S.E., Stine, S.S., Monroe, D.T., Dennis, R.I. Glass, R.I. A Multistate Outbreak of Norwalk Virus Gastroenteritis Associated with Consumption of Commercial Ice. *J. Infect. Dis.* **1991.** 164(5):860-3.
- [13] Wilson, R.; Anderson, L.J.; Holman, R.C.; Gary, G.W.; Greenberg, H.B.; Waterborne gastroenteritis due to the Norwalk agent: clinical and epidemiologic investigation. *Am J Public Health.* **1982.** 72(1):72-4.
- [14] Hoebe, CH.J.P.A.; Vennema, H.; Husman, A.M.D.R.; Duynhoven, Y.T.H.P.; Norovirus Outbreak among Primary Schoolchildren Who Had Played in a Recreational Water Fountain. *Infect. Dis.* **2004.** 15;189(4):699-705.
- [15] Matthews, J.E.; Dickey, B.W.; Miller, R.D.; Felzer, J.R.; Dawson, B.P.; Lee, A.S.; Rocks, J.J.; Kiel, J.; Montes, J.S.; Moe, C.L.; Eisenberg, J.N.; Leon, J.S. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol. Infect.* **2012.** 140(7):1161-72.
- [16] Alfano-Sobsey, E.; Sweat, D.; Hall, A.; Breedlove, F.; Rodriguez, R.; Greene, S.; Pierce, A.; Sobsey, M.; Davies, M.; Ledford, S. L. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol. Infect.* **2012.** 140(2):276-82.
- [17] Cheng, P.K.; Wong, D.K.; Chung, T.W.; Lim, W.W. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J Med Virol.* **2005.** 76(4):593-7.
- [18] Lowther, J.A.; Gustar, N.E.; Powell, A.L.; Hartnell, R.E.; Lees, D.N. Two-Year Systematic Study To Assess Norovirus Contamination in Oysters from Commercial Harvesting Areas in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012.** 78(16): 5812–5817.

- [19] Baert, L. Uyttendaele, M.; Debevere, J. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *Int. J. Food. Microbiol.* **2008**. 31;123(1-2):101-8.
- [20] Maloney, N.S.; Thackray, L.B.; Goel, G.; Hwang, S.; Duan, E.; Vachharajani, P.; Xavier, R.; Virgin, H.W. Essential Cell-Autonomous Role for Interferon (IFN) Regulatory Factor 1 in IFN- $\gamma$ -Mediated Inhibition of Norovirus Replication in Macrophages. *J. Virol.* **2012**. 86(23):12655-64.
- [21] Predmore, A.; Li, J. Enhanced Removal of a Human Norovirus Surrogate from Fresh Vegetables and Fruits by a Combination of Surfactants and Sanitizers. *Appl Environ. Microbiol.* **2011**. 77(14):4829-38.
- [22] Chen, S.Y.; Tsai, C.N.; Lai, M.E.; Chen, C.Y.; Lin, K.L.; Lin T.U.; Cheng-Hsun Chiu, C.H.; Norovirus Infection as a Cause of Diarrhea-Associated Benign Infantile Seizures. *Clin. Infect. Dis.* **2009**. 48(7):849-855
- [23] Weiss, M.; Daeschlein, G.; Kramer, A.; Burchardt, M.; Brucker, S.; Wallwiener, D.; Stope, M.B. Virucide properties of cold atmospheric plasma for future clinical applications. *J. Med. Virol.* **2017**. 89(6):952-959.
- [24] Iloghalu, U., Miller, S., Ewunkem, A. J., Khatiwada, J. R., Davis, S. S., & Williams, L. Electron micrographic representations of mechanisms of action of murine norovirus on atcc tib-71 cells and level of gene expression. *Adv. Microbiol.* **2023**. 13(1):Article:1003.
- [25] Lee, J., Bae, S. Y., Oh, M. H., Seok, J. H., Kim, S., Chung, Y. B., Gowda, K.G.; Mun, J.Y.; Chung, M.S.; Kim, K. H. Antiviral effects of black raspberry (*rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**. 80(6):1196-204.
- [26] Patel, M.M.; Widdowson, M.A.; Glass, R.I.; Akazawa, K.; Vinje, J.; Parashar, U.D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* **2008**. 14(8):1224-31.
- [27] Noel, J.S.; Fankhauser, R.L.; Ando, T.; Monroe, S.S.; Glass, R.I. With global Distribution. *J Infect Dis.* **1999**. 179(6):1334-44.

- [28] Lindesmith, L.C.; Donaldson, E.F.; Lobue, A.D.; Cannon, J.L.; Zheng, D.P.; Vinje, J.; Baric, R.S. Mechanizmy norowirusa GII.4. Trwałość w populacji ludzkiej. *PLoS Med.* **2008.** 87(5): 2803–2813.
- [29] Widdowson, M.A.; Rockx, B.; Schepp, R.; van der Poel, W.H.; Vinje, J.; van Duynhoven, Y.T.; Koopmans, M.P. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J. Med. Virol.* **2005.** 76(1):119-28.
- [30] Widdowson, M.A.; Rockx, B.; Schepp, R.; Poel, W.; Vinjé, J.; Duynhoven, Y. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the netherlands. *J. Med. Virol.* **2005.** 76(1):119-28.
- [31] Pang, X.L.; Joensuu, J.; Vesikari T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1999.** 18(5):420-6.
- [32] Malasao, R.; Maneekarn, N.; Khamrin, P.; Pantip, C.; Tonusin, S.; Ushijima, H.; Peerakome, S. Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J. Med. Virol.* **2008.** 80(10):1749-55.
- [33] Dove, W.; Cunliffe, N.A.; Gondwe, J.S.; Broadhead, R.L.; Molyneux, M.E.; Nakagomi, O.; Hart, C.A. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J. Med. Virol.* **2005.** 77(4):522-7.
- [34] O’Ryan, M.L.; Lucero, Y.; Prado, V.; Santolaya, M.E.; Rabello, M.; Solis, Y.; Berrios, D.; O’Ryan-Soriano, M.A.; Cortes, H.; Mamani, N. Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2009.** 28(10):879-84.
- [35] Monica, B.; Ramani, S.; Banerjee, I.; Primrose, B.; Iturriza-Gomara, M.; Gallimore, C.I.; Brown, D.W.; Fathima, M.; Moses, P.D.; Gray, J.J.; Kang, G. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J. Med. Virol.* **2007.** 79(5): 544–551.
- [36] Kirkwood. C.D.; Clark, R.; Bogdanovic-Sakran, N.; Bishop, R.F. 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(1):96-101.
- [37] Diaz, P., Jeong, S.C.; Lee, S.; Khoo, C.; Koyyalamudi, S.R. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chin. Med.* **2012**. Nov 24;7(1):26.
- [38] Filipovich, A. H. Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant.* **2008**. 42 Suppl 1:S49-S52.
- [39] Desai, R.; Hembree, C.D.; Handel, A.; Matthews, J.E.; Dickey, B.W.; McDonald, S.; Hall, A.J.; Parashar, U.D.; Leon, J.S. Lopman, B. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clin. Infect. Dis.* **2012**. 55(2):189-93
- [40] Van Asten, L.; Van den Wijngaard, C.; Van Pelt, W.; Van de Ka steele, J.; Meijer, A.; Van der Hoek, W.; Kretzschmar, M.; Koopmans, M. Mortality attributable to 9 common infections: significant effect of influenza A, respiratory syncytial virus, influenza B, norovirus, and parainfluenza in elderly persons. *J. Infect. Dis.* **2012**.1;206(5):628-39.
- [41] Esposito, S.; Daleno, C.; Scala, A.; Senatore, L.; Ascolese, B.; Principi, N. Detection of norovirus in respiratory secretions in children with respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J.* **2014**. 33(3):314-6.
- [42] Armbrust, S.; Kramer, A.; Olbertz, D.; Zimmermann, K.; Fusch, C. Norovirus infections in preterm infants: wide variety of clinical courses. *BMC. Res. Notes.* **2009**. 2;2:96.
- [43] Patel, M.M.; Hall, A.J.; Vinje, J.; Parashar, UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J. Clin. Virol.* **2009**. 44(1):1-8.
- [44] Rha, B.; Burrer, S.; Park, S.; Trivedi, T.; Parashar, U.D.; Lopman, B.A. 2013. Emergency department visit data for rapid detection and monitoring of norovirus activity, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**. 19(8): 1214–1221.
- [45] Beersma, M.F.C.; Sukhrie, F.H.A.; Bogerman, J.; Verhoef, L.; Melo, M.M.; Vonk, A. G. Unrecognized norovirus infections in health care institutions and their clinical impact. *J. Clin. Microbiol.* **2012**. 50(9), 3040-3045.

- [46] Zingg, W.; Colombo, C.; Jucker, T.; Bossart, W.; Ruef, C. Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2005**. 19(8):1214–1221.
- [47] Kirking, H.L.; Cortes, J.; Burrer, S.; Hall, A.J.; Cohen, N.J.; Lipman, H.; Kim, C.; Daly, E.R.; Fishbein, D.B. Likely transmission of norovirus on an airplane, October 2008. *Clin. Infect. Dis.* **2010**. 1;50(9):1216-21.
- [48] Wikswo, M.E.; Cortes, J.; Hall, A.J.; Vaughan, G.; Howard, C.; Gregoricus, N.; Cramer, E.H. Disease transmission and passenger behaviors during a high morbidity Norovirus outbreak on a cruise ship, January 2009. *Clin. Infect. Dis.* **2011**. 52(9):1116-22.
- [49] Kaplan, J.E.; Goodman, R.A.; Schonberger, L.B.; Lippy, E.C.; Gary, G.W. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J. Infect. Dis.* **1982**. 146(2):190-7.
- [50] Cannon, R.O.; Poliner, J.R.; Hirschhorn, R.B.; Rodeheaver, D.C.; Silverman, P.R.; Brown, E.A.; Talbot, G.H.; Stine, S.E.; Monroe, S.S.; Dennis, D.T. Glass, R.I. A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J. Infect. Dis.* **1991**. 164(5):860-3.
- [51] Waarbeek, H.L.; Dukers-Muijers, N.H.; Vennema, H.; Hoebe, C.J. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. *J. Clin. Virol.* **2010**. 15(11): 2550.
- [52] Koopman, J.S.; Eckert, E.A.; Greenberg, H.B.; Strohm, B.C.; Isaacson, R.E.; Monto, A.S. Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. *Am. J. Epidemiol.* **1982**. 115(2):173-7.
- [53] Koh, S.J.; Cho, H.G.; Kim, B.H.; Choi, B.Y. An outbreak of gastroenteritis caused by norovirus-contaminated groundwater at a waterpark in Korea. *J. Korean. Med. Sci.* **2011**. 5(7):1646–1654.
- [54] Jones, E.L.; Gaither, M.; Kramer, A.; Gerba, C.P. An analysis of water quality in the Colorado River, 2003–04; an investigation into recurring outbreaks of norovirus among rafters. *Wilderness. Environ. Med.* **2009**. 20(1):6-13.
- [55] Gentry, J.; Vinje, J.; Guadagnoli, D.; Lipp, E.K. Norovirus distribution within an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**. 75(17):5474–5480.

- [56] Green, K.Y.; Kaufman, S.S.; Nagata, B.M.; Chaimongkol, N.; Kim, D.Y.; Levenson, E.A.; Sosnovtsev, S.V. Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine. *Nat. Commun.* **2020**. 6(1) e01136-20.
- [57] Victoria, M.; Guimaraes, F.R.; Fumian, T.M.; Ferreira, F.F.; Vieira, C.B.; Shubo, T.; Leite, J.P.; Miagostovich, M.P. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Water. Health.* **2010**. 8(1):158-65.
- [58] Sima, L.C.; Schaeffer, J.; Le Saux, J.C.; Parnaudeau, S.; Elimelech, M.; Le Guyader, F.S. Calicivirus removal in a membrane bioreactor wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**. 77(15): 5170–5177.
- [59] Da Silva, A.K.; Le Saux, J.C.; Parnaudeau, S.; Pommepuy, M.; Elimelech, M.; Le Guyader, F.S. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**. 73(24):7891-7.
- [60] Kukkula, M.; Maunula, L.; Silvennoinen, E.; von Bonsdorff, C.H. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.* **1999**. 180(6):1771-6.
- [61] Widdowson, M.A.; Sulka, A.; Bulens, S.N.; Beard, R.S.; Chaves, S.S.; Hammond, R.; Salehi, E.D.; Swanson, E.; Totaro, J.; Woron, R.; Mead, P.S. Bresee, J.S.; Monroe, S.S.; Glass, R.I. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**. 11(1): 95–102.
- [62] Lowther, J.A.; Henshilwood, K.; Lees, D.N. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J. Food. Prot.* **2008**. 11(1):95–102.
- [63] Kim, H.Y.; Kwak, I.S.; Hwang, I.G.; Ko, G. Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. *J. Virol. Methods.* **2008**.153(2):104-10.
- [64] McLeod, C.; Hay, B.; Grant, C.; Greening, G.; Day, D. Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *J. Appl. Microbiol.* **2009**. 106(4):1220-30.
- [65] Tian, P.; Yang, D.; Mandrell, R. 2011. A simple method to recover norovirus from fresh produce with large sample size by using histo-blood group antigen-conjugated to

- magnetic beads in a recirculating affinity magnetic separation system (RCAMS). *Int. J. Food. Microbiol.* **2011.** 30;147(3):223-7.
- [66] Tian, P.; Yang, D.; Mandrell, R. Differences in the binding of human norovirus to and from romaine lettuce and raspberries by water and electrolyzed waters. *J. Food. Prot.* **2011.** 74(8):1364-9.
- [67] Hall, A.; Eisenbart, V.; Etingüe, A.; Gould, L.; Lopman, B.; Parashar, U. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, united states, 2001–2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2012.** 18(10): 1566–1573.
- [68] Kuo, H.W.; Schmid, D.; Jelovcan, S.; Pichler, A.M.; Magnet, E.; Reichart, S.; Allerberger, F. A foodborne outbreak due to norovirus in Austria, 2007. *J Food Prot.* **2009.** 72(1), 193-196.
- [69] Anderson, A.D.; Garrett, V.D.; Sobel, J.; Monroe, S.S.; Fankhauser, R.L.; Schwab, K.J.; Bresee, J.S.; Mead, P.S.; Higgins, C.; Campana, J.; Glass, R.I.; Outbreak Investigation Team. 2001. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am. J. Epidemiol.* **2012.** 1;154(11):1013-9
- [70] Boxman, I.; Verhoef, L.; Dijkman, R.; Hägele, G.; Loeke, N. Year-round prevalence of norovirus in the environment of catering companies without a recently reported outbreak of gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011.** 77(9):2968–2974.
- [71] Hallowell, B.D.; Parashar, U.D.; Hall, A.J. Epidemiologic challenges in norovirus vaccine development. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2019.** 15(6): 1279–1283.
- [72] Kambhampati, A.; Koopmans, M.; Lopman, B. A. Burden of norovirus in healthcare facilities and strategies for outbreak control. *J. Hosp. Infect.* **2015.** 89(4):296-301
- [73] Stoyanova, A. Noroviruses - a hidden threat. *Probl. Infect. Parasit. Dis.* **2022.** 49(3)
- [74] Ahmed, K.; Dony, J.J.F.; Mori, D.; Haw, L.Y.; Giloi, N.; Jeffree, M.S.; Iha, H. An outbreak of gastroenteritis by emerging norovirus gii.2[p16] in a kindergarten in kota kinabalu, malaysian borneo. *Sci. Rep.* **2020.** 28;10(1):7137.
- [75] Lopman, B.A.; Steele, A.D., Kirkwood, C.D.; Parashar, U.D. The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control. *PLOS Med.* **2016.** 26;13(4):e1001999



- [76] Mattison, C.P.; Cardemil, C.V.; Hall, A.J. Progress on norovirus vaccine research: public health considerations and future directions. *Expert Rev. Vaccines*. **2018**. 17(9):773-784
- [77] Karst, S.M.; Tibbetts, S.A. Recent advances in understanding norovirus pathogenesis. *J. Med. Virol.* **2016**. 88(11):1837-43.
- [78] Wobus, C.E.; Karst, S.M.; Thackray, L.B.; Chang, K.O.; Sosnovtsev, S.V.; Belliot, G.; Krug, A.; Mackenzie, J.M.; Green, K.Y.; Virgin, H.W. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* **2004**. 2(12):e432
- [79] Herod, M.R.; Salim, O.; Skilton, R.J.; Prince, C.A.; Ward, V.K.; Lambden, P.R.; Clarke, I.N.; Expression of the murine norovirus (MNV) ORF1 polyprotein is sufficient to induce apoptosis in a virus-free cell model. *PLoS One*. **2014**. 5;9(3):e90679.
- [80] Roth, A.N.; Karst, S. M. Norovirus mechanisms of immune antagonism. *Curr. Opin. Virol.* **2016**. 16: 24–30.
- [81] Sosnovtsev, S.V.; Belliot, G.; Chang, K.O.; Prikhodko, V.G.; Thackray, L.B.; Wobus, C.E.; Karst, S.M.; Virgin, H.W.; Green, K.Y. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol.* **2006**. 80(16): 7816–7831.
- [82] Oishi, W.; Sato, M.; Kubota, K.; Ishiyama, R.; Takai-Todaka, R.; Haga, K.; Katayama, K.; Sano, D. Experimental Adaptation of Murine Norovirus to Calcium Hydroxide. *Front. Microbiol.* **2022**. 31:13:848439.
- [83] Thorne, L.G.; Goodfellow I.G. Norovirus gene expression and replication, *J. Gen. Virol.* **2014**. 95(Pt 2):278-291.
- [84] Mumphrey, S.; Changotra, H.; Moore, T.; Heimann-Nichols, E.; Wobus, C.; Reilly, M.; Moghadamfalahi, M.; Shukla, D.; Karst, S. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by stat1-dependent interferon responses. *J. Virol.* **2007**. 81(7), 3251-3263.

- [85] Zarządzanie ICTVdB (2006). 00.012.0.03. Norowirus. W: ICTVdB — The Universal Virus Database, wersja 4. Büchen-Osmond, C. (red), Columbia University, Nowy Jork, USA.
- [86] Roth, A.N.; Helm, E.W.; Mirabelli, C.; Kirsche, E.; Smith, J.C.; Eurell, L.B.; Ghosh, S.; Altan-Bonnet, N.; Wobus, C.E.; Karst, S.M. Norovirus infection causes acute self-resolving diarrhea in wild-type neonatal mice. *Nat. Commun.* **2020**. 11, 2968.
- [87] Dycke, J.V.; Neyts, J.; Rocha-Pereira, J. Assessing the Efficacy of Small Molecule Inhibitors in a Mouse Model of Persistent Norovirus Infection. *Bio-Protocol.* **2018**. 8, e2831.
- [88] Taube, S.; Kolawole, A.O.; Höhne, M.; Wilkinson, J.E.; Handley, S.A.; Perry, J.W.; Thackray, L.B.; Akkina, R.; Wobus, C.E. A mouse model for human norovirus. *mBio.* **2013**, 4, e00450-13.
- [89] Peiper, A.M.; Helm, E.W.; Nguyen, Q.; Phillips, M.; Williams, C.G.; Shah, D.; Tatum, S.; Iyer, N.; Grodzki, M.; Eurell, L.B.; Peiper, A.M.; Helm, E.W.; Nguyen, Q.; Phillips, M.; Williams, C.G.; Shah, D.; Tatum, S.; Iyer, N.; Grodzki, M.; Eurell, L.B. Infection of neonatal mice with the murine norovirus strain WU23 is a robust model to study norovirus pathogenesis. *Lab. Anim.* **2023**. 52, 119–129.
- [90] Weerathunge, P.; Ramanathan, R.; Torok, V.A.; Hodgson, K.; Xu, Y.; Goodacre, R.; Behera, B.K.; Bansal, V. Ultrasensitive Colorimetric Detection of Murine Norovirus Using NanoZyme Aptasensor. *Anal Chem.* **2019**. 5;91(5):3270-3276.
- [91] Narayan, R. Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications, I ed., Woodhead Publishing, Cambridge UK, 2016. ISBN: 9780081000724 156-250.
- [92] Cecchini, R.; Cecchini, A.L. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. *Medical hypotheses.* **2020**. 143:p. 110102.
- [93] Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews.* **2012**. 70(5):257–265.
- [94] Ntyonga-Pono, M.P. COVID-19 infection and oxidative stress: an under-explored approach for prevention and treatment? *Pan. Afr. Med. J.* **2020**. 29;35(Suppl 2):12.
- [95] Kazura, W.; Michalczyk, K.; Skrzep-Poloczek, B.; Chelmecka, E.; Zalejska-Fiolka, J.; Michalski, M.; Kukla, M.; Jochem, J.; Rutkowski, J.; Stygar, D.

- Liver Oxidative Status, Serum Lipids Levels after Bariatric Surgery and High-Fat, High-Sugar Diet in Animal Model of Induced Obesity. *Int J Mol Sci.* **2023**. 20;24(22):16535.
- [96] Kurutas, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J.* **2015**.15(1):p. 71.
- [97] Balmus, I.M.; Ciobica, A.; Antioch, I.; Dobrin, R.; Timofte. D. Oxidative stress implications in the affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**. 2016;25.
- [98] Abedi, A.; Ghobadi, H.; Sharghi, A.; Iranpour, S.; Fazlzadeh, M.; Aslani, M.R.; Effect of saffron supplementation on oxidative stress markers (MDA, TAC, TOS, GPx, SOD, and pro-oxidant/antioxidant balance): An updated systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Front Med. (Lausanne)*. **2023** 1;10:1071514.
- [99] Tsikas, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* **2017**. 1;524:13-30.
- [100] Fernandes, I.G.; de Brito, C.A.; Dos Reis, V.M.S.; Sato, M.N.; Pereira, N.Z. SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses: What Does Oxidative Stress Have to Do with It? *Oxid Med Cell Longev.* **2020**. 21;2020:8844280.
- [101] Kaufman, S.S.; Green, K.Y.; Korba, B.E. Treatment of norovirus infections: moving antivirals from the bench to the bedside. *Antiviral Research.* **2014**. 105, 80-91.
- [102] Abdelrahman, M.; Hirata, S.; Ito, S.; Yamauchi, N.; Shigyo, M. Compartmentation and localization of bioactive metabolites in different organs of *allium roylei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**. 78(7), 1112-1122.
- [103] Gasmi, A.; Tippairote, T.; Mujawdiya, P. K.; Peana, M.; Menzel, A.; Dadar, M.; Gasmi Benahmed, A.; Bjørklund, G. Micronutrients as immunomodulatory tools for covid-19 management. *Clin. Immunol.* **2020**, 108545.
- [104] Shah, M.; Rasul, A.; Yousaf, R.; Haris, M.; Faheem, H.; Hamid, A.; Khan H.; Khan, A.H.; Aschner, M.; Batiha, G. Combination of natural antivirals and potent

- immune invigorators: a natural remedy to combat covid-19. *Phytother. Res.* **2021**. 35(12), 6530-6551.
- [105] Salem, M.M.; Davidorf, F.H.; Abdel-Rahman, M.H. In vitro anti-melanoma activity of phenolic compounds from the Egyptian medicinal plant *Acacia nilotica*. *Phytotherapy*. **2011**. 82(8):1279-84.
- [106] Lombrea, A.; Antal, D.; Ardelean, F.; Avram, S.; Pavel, I.Z.; Vlaia, L.; Mut, A.-M.; Diaconeasa, Z.; Dehelean, C.A.; Soica, C.; et al. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**. 17;21(24):9653.
- [107] Asensio, C.M.; Grosso, N.R.; Juliani, H.R. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.). Essential oils from Central and Southern Argentina. *Ind. Crop. Prod.* **2015**. 63:203–213.
- [108] Ross, I.A. *Medicinal Plants of the World*. Vol. 3. Humana Press Inc, 2005. ISBN: 9781588296825.
- [109] Sharifi-Rad, M.; Mnayer, D.; Morais-Braga, M.F.B; Carneiro, J. N. P.; Bezerra, C. F.; Coutinho, H.D.M.; Salehi, B.; Martorell, M.; Del Mar Contreras, M.; Soltani-Nejad, A.; Uribe, Y.A.H.; Yousaf, Z.; Iriti, M.; Sharifi-Rad, J. Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytother Res.* **2018**. 32(9):1653-1663
- [110] Sukoco, A.; Novenda1, I.; Maryanto, Kuswardhani, N.; Sari, P. Chemical compounds and antioxidant activity in caffeinated and decaffeinated green robusta coffee beans enriched with ginger extract, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **2021** .709 012035
- [111] Baghiani, A. Determination of Total Phenolics Contents, Antioxidant Capacity of *Thymus vulgaris* Extracts using Electrochemical and Spectrophotometric methods. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**. 13(8)
- [112] Mohamed, A; Mohamed, A.; Omar, A.A. A study to find thyme oil dose that kill 50% of mice and minimal dose that kill all mice and maximum nonlethal Dose. *Nat. Sci.* **2013**; 11(12): 52-53.
- [113] Smeriglio, A.; Barreca, D.; Bellocco, E.; Trombetta, D. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocya-nins. *Phytother Res.* **2016**. 30(8):1265-86.

- [114] Duke, J.A. *Handbook of Medicinal Herbs*. Florida: CRC Press; 2000. pp. 630–632. ISBN: 9780849329279.
- [115] Heinrich, M.; Kufer, J.; Leonti, M.; Pardo-de-Santayana, M. Ethnobotany and ethnopharmacology-interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* **2006**.19;107(2):157-60.
- [116] Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* **2007**. 105:940–949.
- [117] Gahrue, H.; Hosseini, S.; Taghavifard, M.; Eskandari, M.; Golmakani, M.; Shad, E. Lipid oxidation, color changes, and microbiological quality of frozen beef burgers incorporated with shirazi thyme, cinnamon, and rosemary extracts. *J. Food Qual.* **2017**. 9;6350156
- [118] Popa, C.V.; Farcasanu, I.; Jipa, S.; Zaharescu, T.; Danet, A. Chemiluminescence Determination of the Total Anti-oxidant Capacity of Rosemary Extract. *Rev. Chim.* **2012**. 21(4):233-8.
- [119] Manandhar, N.P. *Plants and People of Nepal*. Portland, OR: Timber Press, Inc., 2002. ISBN: 0881925276.
- [120] Wtanabe, T.; Rajbhandari, K.R.; Malla, K.J.; Devkota, H.P.; Yahara, S. A *Handbook of Medicinal Plants of Nepal Supplement I*. Ayurseed, L.E.I.; Kanagawa, Japan. 2013. ISBN: 974-7799-58-8.
- [121] Singh, H. Ethnobotanical Studies on *Urtica dioica* Linn. among the Bhotias of Chamoli Garhwal, U.P. *J. Econ. Tax-on. Bot.* **1989**. 13:719–724.
- [122] Kőszegi, K.; Békássy-Molnár, E.; Koczka, N.; Kerner, T.; Stefanovits-Bányai, E. Changes in Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) from Spring to Autumn. *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2020**. 64(4), pp. 548–554, 2020
- [123] Hudson, J.B. Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. *Biomed. Res. Int.* **2012**. 769896.
- [124] Bernardi, S.; Bò, C.D.; Marino, M.; Gargari, G.; Cherubini, A.; Andrés-Lacueva, C.; Hidalgo-Liberona, N.; Peron, G.; González-Dominguez, R.; Kroon, P.; Kirkup, B.; Porrini, M.; Guglielmetti, S.; Riso, P. Polyphenols and intestinal permeability: rationale and future perspectives. *J. Agric. Food Chem.* **2019**. 68(44):12476-12484

- [125] Zhao, F.; Dahanayake, N.; Yang, Y.; Wu, H. Anther culture and haploid plant regeneration in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2006.** 86(1):55-62
- [126] Nyalambisa, M.; Oyemitan, I. A.; Matewu, R.; Oyedeji, O. O.; Oluwafemi, O. S.; Songca, S. P.; Nkeh-Chungag, B. N.; Oyedeji, A.O. Volatile constituents and biological activities of the leaf and root of *Echinacea* species from South Africa. *Saudi Pharm. J.* **2017.** 25(3):381-386.
- [127] Dvorackova, E.; Snoblova, M.; Chromcova, L. Hrdlicka, P.; Effects of extraction methods on the phenolic compounds contents and antioxidant capacities of cinnamon extracts. *Food Sci. Biotechnol.* **2015.** 24, 1201-1207.
- [128] Cutler, R.R.; Wilson, P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Biomed. Sci.* **2004.** 61(2):71-4.
- [129] Ringh, R.; Singh, K. *Garlic: a spice with wide medicinal actions.* J. Pharmacogn. Phytochem. **2019.** E-ISSN: 2278-4136.
- [130] Córdoba, N., Pataquiva, L., Osorio, C., Moreno, F., & Ruiz, R. (2019). Effect of grinding, extraction time and type of coffee on the physicochemical and flavour characteristics of cold brew coffee. *Sci. Rep.* **2019.** 9(1):8440.
- [131] Cho, Y.; Yeum, K.; Chen, C.; Beretta, G.; Tang, G.; Krinsky, N. I.; Yoon, S.; Lee-Kim, T.C.; Blumberg, J.B.; Russell, R. M. Phytonutrients affecting hydrophilic and lipophilic antioxidant activities in fruits, vegetables and legumes., *J. Sci. Food Agric.* **2007.** 87(6), 1096-1107.
- [132] Russell, W.M.; Burch, R.L.; *The Principles of Humane Experimental Technique.* London, UK: Methuen; **1959.**
- [133] Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951.** 193 (1): 265-275.
- [134] Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* **2004.**37:277–285.
- [135] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **1984.** 105:121–126

- [136] Carlberg, I.; Mannervik, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **1985**.113:484–490.
- [137] Mannervik, B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **1985**.113:490–495.
- [138] Habig W.H., Jakoby W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* **1981**. 77:398–405
- [139] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* **2005**. 38:1103–1111.
- [140] Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**.95:351–358.
- [141] Zeedan, G.S.G.; Abdalhamed, A.M. Antiviral effects of plant extracts used in the treatment of important animal viral diseases. *World Vet. J.* **2021**. 11(4), 521-533.
- [142] Imai, K.; Hagi, A.; Inoue, Y.; Amarasiri, M.; Sano, D. Virucidal Efficacy of Olanexidine Gluconate as a Hand Antiseptic Against Human Norovirus. *Food Environ Virol.* **2020**.12(2):180-190.
- [143] Blainski, A.; Lopes, G.C.; Mello, J.C.P.D. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L. *Molecules.* **2013**. 18(6): 6852–6865.
- [144] Sembiring, E.; Elya, B.; Sauriasari, R. Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of caesalpinia bonduc (l.) roxb. *Pharmacogn. J.* **2017**. 10,1,123-127.
- [145] Brown, J.; Roy, S.; Ruis, C.; Romero, E.; Shah, D.; Williams, R.; Breuer, J. Norovirus whole-genome sequencing by sureselect target enrichment: a robust and sensitive method. *J. Clin. Microbiol.* **2016**. 54(10), 2530-2537.
- [146] Hsu, C.C.; Piotrowski, S.L.; Meeker, S.M.; Smith, K.D.; Maggio-Price, L.; Treuting, P.M. Histologic Lesions Induced by Murine Norovirus Infection in Laboratory Mice. *Vet. Pathol.* **2016**. 53(4):754-763.
- [147] Kennedy, P.; Quan, P.; Lipkin, W. Viral encephalitis of unknown cause: current perspective and recent advances. *Viruses.* **2017**. 9(6), 138.
- [148] Hubálek, Z. and Rudolf, I. Tick-borne viruses in europe. *Parasitol. Res.* **2012**. 111(1), 9-36

- [149] Uzunbayır, H. and Apaydin, F. (2021). Protective role of ferulic acid on testis-histoarchitecture and oxidative damages induced by dimethoate in rats. *Brazilian. J. Exp. Clin.* **2021**. 40(4):740-747.
- [150] Karkhanei, B.; Talebi Ghane, E.; Mehri, F. Evaluation of oxidative stress level: total antioxidant capacity, total oxidant status and glutathione activity in patients with COVID-19. *New Microbes New Infect.* **2021**. 42:100897.
- [151] Yang, S.; Li, M.; Cheng, J.; Wan, G.; Zhou, Y.; Jia, H.; Wei, H.; Song, R.; Sheng, L.; Wang, H.; Wang, L.; Hua, W. Diagnostic determination of Norovirus infection as one of the major causes of infectious diarrhea in HIV patients using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Int. J. STD. AIDS.* **2019**. 141:1220–1227.
- [152] [https://sklep.alablaboratoria.pl/badanie/25644/wykrywanie\\_materialu\\_genetycznego\\_rotawirusa\\_norowirusa\\_oraz\\_astrowirusa](https://sklep.alablaboratoria.pl/badanie/25644/wykrywanie_materialu_genetycznego_rotawirusa_norowirusa_oraz_astrowirusa). 01.05.2024r.
- [153] <https://www.gov.pl/web/wsse-bydgoszcz> 01.05.2024r.
- [154] Ozawa, K.; Oka, T.; Takeda, N.; Hansman, G.S. Norovirus Infections in Symptomatic and Asymptomatic Food Handlers in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **2007**. 45(12):3996–4005.
- [155] Rutjes, S.A.; van den Berg, H.H.J.L.; Lodder, W.J.; de Roda Husman, A.M. Real-Time Detection of Noroviruses in Surface Water by Use of a Broadly Reactive Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**. 72(8):5349–5358.
- [156] Sharaf, H.E.; Morsi, S.S.; Gerges, M.A. Performance characteristics of enzyme linked immunosorbent assay and rapid immunochromatographic test for routine screening of human norovirus African. *J. Clin. Exp. Microbiol.* **2016**. 17:205–212.
- [157] Mishra, M.; Tiwari, S.; Gomes, A.V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev. Proteomics*, **2017**. 14(11):1037–1053.
- [158] Möller, L.; Schünadel, L.; Nitsche, A.; Schwebke, I.; Hanisch, M.; Laue, M. Evaluation of Virus Inactivation by Formaldehyde to Enhance Biosafety of Diagnostic Electron Microscopy. *Viruses*. **2015**. 7(2): 666–679.



- [159] Tirado-Kulieva, V.A.; Hernández-Martínez, E.; Choque-Rivera, T.J. Phenolic compounds versus SARS-CoV-2: An update on the main findings against COVID-19. *Heliyon*. **2022**. 20;8(9):e10702.
- [160] El-Toumy S.A.; Salib, J.Y.; El-Kashak, W.A.; Marty, C.; Bedoux, G.; Bourgougnon, N. Antiviral effect of polyphenol-rich plant extracts on herpes simplex virus type 1. *Food Sci. Hum. Wellness*. **2018**. 7(1).
- [161] Diaz, P.; Jeong, S.; Lee, S.; Khoo, C.; Koyyalamudi, S. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chin. Med*. **2012**. 24;7(1)26.
- [162] Liczbiński, P.; Bukowska B. Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. *Ind. Crops. Prod*. **2022**. 175:114265.
- [163] Sida, S., Samakradhamrongthai, R. S., Utama-Ang, N. Influence of maturity and drying temperature on antioxidant activity and chemical compositions in ginger. *Curr. Appl. Sci. Technol*, **2019**. 1:19.
- [164] Ziarno, M.; Kozłowska, M.; Ratusz, K.; Hasalliu, R. Effect of the Addition of Selected Herbal Extracts on the Quality Characteristics of Flavored Cream and Butter. *Foods*. **2023**. 19;12(3):471.
- [165] Yu, M.S.; Lee, J.; Lee, J.M.; Kim, Y.; Chin, Y.W.; Jee, J.G.; Keum Y.S.; Jeong Y.J.; Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of SARS virus helicase, nsP13. *Bioorg. Med. Chem*. **2012**. 15;22(12):4049-54.
- [166] Vázquez-Calvo, Á.; de Oya, N.J.; Martín-Acebes, M.A.; García-Moruno, E.; Saiz, J.C. Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue. *Virus. Front. Microbiol*. **2017**. 8;1314.
- [167] Tsai, H., Yune, P. S., & Rao, M. Norovirus disease among older adults. *Ther. Adv. Infect. Dis*. **2022**. 14;9;2049936122136760.
- [168] Nani, A.; Murtaza, B.; Khan, N.A.; Hichami, A. Antioxidant and anti-inflammatory potential of polyphenols contained in mediterranean diet in obesity: molecular mechanisms. *Molecules*. **2021**. doi:10.3390/molecules26040985.

- [169] Salem, M.M.; Davidorf, F.H.; Abdel-Rahman, M.H. In vitro anti-melanoma activity of phenolic compounds from the Egyptian medicinal plant *Acacia nilotica*. *Phytotherapy*. **2011**. 82(8):1279-84.
- [170] Lombrea, A.; Antal, D.; Ardelean, F.; Avram, S.; Pavel, I.Z.; Vlaia, L.; Mut, A.-M.; Diaconeasa, Z.; Dehelean, C.A.; Soica, C.; et al. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**. 17;21(24):9653.
- [171] Asensio, C.M.; Grosso, N.R.; Juliani, H.R. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.). Essential oils from Central and Southern Argentina. *Ind. Crop. Prod.* **2015**. 63:203-213.
- [172] Supritha, P.; Radha, K.V. Estimation of phenolic compounds present in the plant extracts using high-pressure liquid chromatography, antioxidant properties, and its antibacterial activity. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **2018**. 28(4): 1845
- [173] Sarowska, J.; Wojnicz, D.; Jama-Kmiecik, A., Frej-Mądrzak, M.; Choroszy-Król, I. Antiviral Potential of Plants against Noroviruses. *Molecules*. **2021**. 26(15), 4669;
- [174] Abdelfadel, M.M.; Khalaf, H.H.; Sharoba, A.M.; Assous, M. T. M. Effect of extraction methods on antioxidant and antimicrobial activities of some spices and herbs extracts. *J. Food Technol. Nutr. Sci.* **2016**.;1(1), 1-14.
- [175] Lopes, G. R.; Passos, C. P.; Rodrigues, C.; Teixeira, J. A.; Coimbra, M. A. Impact of microwave-assisted extraction on roasted coffee carbohydrates, caffeine, chlorogenic acids and coloured compounds. *Food Res. Int.* **2020**. 129:108864.

## 11. LISTA TABEL

<b>Tabela I.</b> Poziomy markerów stresu oksydacyjnego w tkankach mózgu, mózdzku, wątroby, płuc i nerek pobranych od wszystkich myszy kontrolnych (n = 7) i myszy zakażonych MNV, uśmierconych 7 dni po podaniu wirusa (n = 7). .....	34
<b>Tabela II.</b> Stężenia ekstraktów roślinnych użyte w badaniu cytotoksyczności oraz wyniki cytotoksyczności.....	46
<b>Tabela III.</b> Działanie przeciwwirusowe ekstraktów roślinnych parzonych na zimno i stężonych na zimno przeciwko norowirusowi mysie (MNV) określone poprzez pomiar całkowitej zawartości fenoli (TPC), zawartości flawonoidów i zdolności przeciwutleniającej w ekstraktach roślinnych. ....	47

## 12. LISTA RYCIN

<b>Rycina 1.</b> Mysi norowirus (MNV), transmisyjny mikroskop elektronowy. ....	14
<b>Rycina 2.</b> Budowa warstwy aktywnej bioczuJNIka. ....	23
<b>Rycina 3.</b> Zmiany histopatologiczne w tkance wątrobY myszy szczepu C56B1/6J poddanych infekcji norowirusowej (grupa kontrolna vs gr po 3, 4 i 7 dniach od zakażenia). ....	29
<b>Rycina 4.</b> Zmiany histopatologiczne obserwowane w tkance śródmózgowia myszy szczepu C56B1/6J poddanych infekcji norowirusowej oraz w grupie kontrolnej. ....	30
<b>Rycina 5.</b> Zmiany histopatologiczne w tkance mózdzku myszy szczepu C56B1/6J podanych infekcji norowirusem oraz w grupie kontrolnej. ....	31
<b>Rycina 6.</b> Zmiany histopatologiczne w tkance płuc i nerek myszy szczepu C56B1/6J podanych infekcji norowirusem oraz w grupie kontrolnej. ....	32
<b>Rycina 7.</b> Zdjęcia z mikroskopu SEM powierzchni po każdym etapie modyfikacji. Obrazy SEM morfologii powierzchni elektrody modyfikowanej za pomocą: SAM (a), AuNPs (b), SAM/AuNPs (c), SAM/AuNPs/EDC/NHS (d), SAM/AuNPs/EDC/NHS/przeciwciało (e). ....	38
<b>Rycina 8.</b> Widmo cyklicznego woltamigramu dla każdej z warstw na złotej elektrodzie. Woltamogram CV, przedstawiający przygotowanie elektrochemicznego immunosensora do wykrywania NoV przy użyciu 5 mM sondy redoks żelazo/elazocyjanek, KNO <sub>3</sub> stosowanej jako elektrolit pomocniczy; zakres potencjałów: -0,4-0,6 V; szybkoc skanowania: 50 mV s <sup>-1</sup> ; w porownaniu z Ag/AgCl. ....	39
<b>Rycina 9.</b> Wykresy (a) DPV dla ronych rozcieńczeń NoV w potencjalnym zakresie 0,4-0,6 V w porownaniu z Ag/AgCl; (b) liniowa zależnośc między rozcieńczeniem bieżącym i NoV. ....	40
<b>Rycina 10.</b> Wyniki pomiarów probek żywności i bakterii przy pomocy ronicowej woltametrii pulsowej (DPV). ....	41
<b>Rycina 11.</b> Skan cyklicznej woltamperometrii czujnika w obecności 5 mM Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> /Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-</sup> w 0,1 M KNO <sub>3</sub> po 2 tygodniach. ....	42
<b>Rycina 12.</b> Wyniki probek żywności i bakterii z NoV i bez, zbadane przy pomocy RT-qPC. ....	43

## 13. ZAŁĄCZNIKI

### 13.1. Publikacja 1



Communication

## Oxidative Stress Markers and Histopathological Changes in Selected Organs of Mice Infected with Murine Norovirus 1 (MNV-1)

Paulina Janicka <sup>1,2,\*</sup>, Dominika Stygar <sup>3</sup>, Elżbieta Chelmecka <sup>4</sup>, Piotr Kuroпка <sup>5</sup>, Arkadiusz Miążek <sup>6</sup>, Aleksandra Studzińska <sup>6</sup>, Aleksandra Pogorzelska <sup>1</sup>, Katarzyna Pala <sup>2</sup> and Barbara Bażanów <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Pathology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 31, 50-375 Wrocław, Poland; paulina.janicka@upw.edu.pl (P.J.); aleksandra.pogorzelska@upw.edu.pl (A.P.)
  - <sup>2</sup> Food4Future Technologies Sp. z o.o., Tarasa Szewczenki 24, 51-351 Wrocław, Poland; kasia@f4ftech.com
  - <sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences in Zabrze, Medical University of Silesia, Jordana 19, 41-808 Zabrze, Poland; dstygar@sum.edu.pl
  - <sup>4</sup> Department of Statistics, Department of Instrumental Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences in Sosnowiec, Medical University of Silesia in Katowice, Ostrogórska 30, 41-200 Sosnowiec, Poland; echelmecka@sum.edu.pl
  - <sup>5</sup> Division of Histology and Embryology, Department of Biotechnology and Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, 50-635 Wrocław, Poland; piotrkuroпка@upw.edu.pl
  - <sup>6</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 31, 50-375 Wrocław, Poland; arkadiusz.miazek@upw.edu.pl (A.M.); aleksandra.studzińska@upw.edu.pl (A.S.)
- \* Correspondence: barbara.bazanow@upw.edu.pl  
<sup>†</sup> PhD Student in the 4th Edition of the Implementation Doctorate Programme—Ministry of Education and Science.



**Citation:** Janicka, P.; Stygar, D.; Chelmecka, E.; Kuroпка, P.; Miążek, A.; Studzińska, A.; Pogorzelska, A.; Pala, K.; Bażanów, B. Oxidative Stress Markers and Histopathological Changes in Selected Organs of Mice Infected with Murine Norovirus 1 (MNV-1). *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3614. <https://doi.org/10.3390/ijms25073614>

Academic Editor: Masahiro Fujimura

Received: 25 February 2024

Revised: 19 March 2024

Accepted: 21 March 2024

Published: 23 March 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** This paper describes the effects of murine norovirus (MNV) infection on oxidative stress and histopathological changes in mice. This study uses histopathological assays, enzymatic and non-enzymatic antioxidant markers, and total oxidative status and capacity (TOS, TAC). The results suggest that MNV infection can lead to significant changes with respect to the above-mentioned parameters in various organs. Specifically, reduced superoxide dismutase (SOD), Mn superoxide dismutase (MnSOD), catalase (CAT), and glutathione reductase (GR) activities were observed in liver tissues, while higher MnSOD activity was observed in kidney tissues of MNV-infected mice when compared to the control. GR activity was lower in all tissues of MNV-infected mice tested, with the exception of lung tissue. This study also showed that norovirus infection led to increased TOS levels in the brain and liver and TAC levels in the brain, while TOS levels were significantly reduced in the kidneys. These changes may be due to the production of reactive oxygen species (ROS) caused by the viral infection. ROS can damage cells and contribute to oxidative stress. These studies help us to understand the pathogenesis of MNV infection and its potential effects on oxidative stress and histopathological changes in mice, and pave the way for further studies of the long-term effects of MNV infection.

**Keywords:** oxidative stress; bacterial and viral diseases

### 1. Introduction

Viral infections are one of the major causes of global health issues [1], where noroviruses (NoVs) are one of the most common causes of gastroenteritis in humans in all age groups worldwide [2]. These pathogens belong to the family *Caliciviridae* and are a type of non-enveloped, single-stranded RNA viruses characterized by being positive sense [3]. Noroviruses have also been identified in a variety of animal species, including pigs, cows, sheep, cats, dogs, rats, and mice, but murine norovirus (MNV) is the only representative of

this family showing the ability to replicate in cell culture and laboratory animals [4], and at the same time, it is one of the most common pathogens of laboratory mice [5].

The initiation of effective therapy, as well as ensuring the removal of side effects caused by viral infections, requires a deep understanding of the pathogenesis and effects induced by norovirus infections at the cellular, tissue, and organ levels.

Wild-type mice (adults) infected with MNV show subclinical intestinal infection without gastric symptoms [6]. In contrast, MNV infection is lethal in immunocompromised mice (for example in immunodeficient mice with impaired innate immunity and negative expression of STAT1 and *Rag2* genes). There has been a steady increase in MNV infections in laboratories, where non-susceptible mouse strains infect susceptible mice. After administration of the virus to the immunocompromised animals, systemic disease develops—bloating, intestinal pathology, and diarrhea that result in weight loss [7–9]. Currently, MNV is the most widespread pathogen in animal facilities [10]. Mice infected with asymptomatic MNV are the source of the virus, and they can adversely affect other laboratory animals and undermine the reliability of studies conducted on animals [11]. Several histopathological changes were observed during MNV infection in different strains of laboratory mice. NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD-scid) immunodeficient mice showed no lesions, while liver and small intestine lesions were noted in STAT1<sup>-/-</sup> mice, and *Rag2*/STAT1<sup>-/-</sup> mice showed liver, lung, and brain lesions. The latter were also seen in infected animals of the IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> strain [4,12,13]. Histopathological changes in the colon were observed in immunocompromised B6.129P2-Il10tm1Cgn/JZtm, C3Bir.129P2-Il10tm1Cgn/JZtm, and germ-free B6.129P2-Il10tm1Cgn/JZtm mice [11].

Pathological changes in organs observed over the course of infection may result from the disruption of metabolic pathways within the infected cell. Viral proliferation takes over the functions of host cells and causes a significant imbalance in the intracellular physiological processes and systems, including the redox system [10]. Oxidative stress, resulting from the imbalance between the antioxidant systems and toxic reactive oxygen species (ROS) [14], can be triggered by a wide variety of viral infections, including HIV 1, hepatitis B, C, and D viruses, herpes viruses, and respiratory viruses, such as coronaviruses [15]. However, oxidative stress and ROS generation are essential for numerous biological and physiological functions. Increased ROS concentration triggers enzymatic antioxidant systems, such as superoxide dismutase (SOD, MnSOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT), considered the main oxidative stress markers, and non-enzymatic antioxidant systems including total oxidative status (TOS), total antioxidant capacity (TAC), and malondialdehyde (MDA) [16].

Superoxide dismutase (SOD), with its isoforms, e.g., MnSOD, is one of the main antioxidative enzymes that neutralize superoxide ions [17]. It mainly catalyzes the conversion of superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which is subsequently converted into H<sub>2</sub>O by GPx and CAT [18]. Oxidative stress caused by an imbalance in oxidant/antioxidant markers and disruption of endogenous antioxidant systems can be quantified using total antioxidant capacity (TAC), total oxidative status (TOS) [19], and MDA concentration, which is considered a marker of oxidative stress, more specifically of lipid peroxidation understood as lipid damage caused by ROS [20].

The comprehension of relevant antioxidant mechanisms and the relationship between viral infection pathological changes and oxidative stress may play a crucial role in understanding viral pathogenesis and identifying potential therapeutic targets, especially as antiviral therapies are often unavailable. Therefore, instead of acting directly on the virus, the effects of infection can be reduced by using therapy to limit the effects of oxidative stress.

The purpose of this project was to study the effects of MNV infection on oxidative stress and histopathological changes in C56Bl/6j mice.

## 2. Results

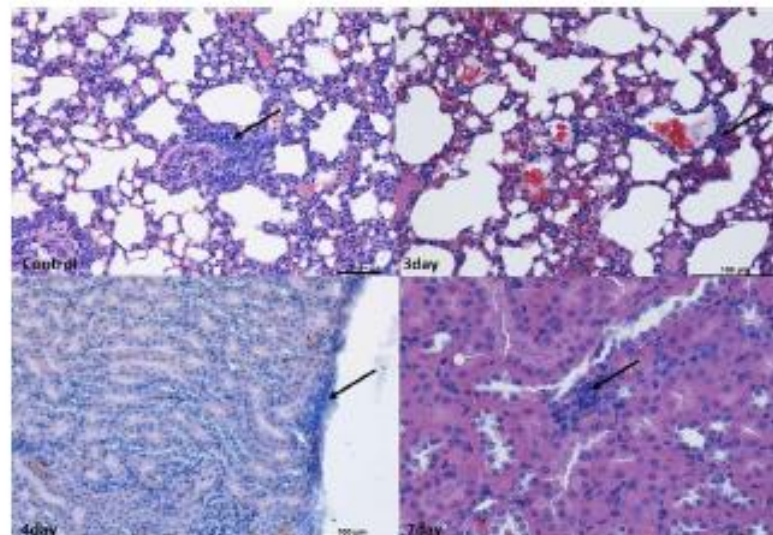
### 2.1. Assessing the Effectiveness of Infection

Due to the rapid rate of elimination of the virus from the body, RT-PCR tests showed such low titers that the result was not statistically significant. Successful infection of mice was confirmed by the detection of antibodies to norovirus in the serum of infected mice by the virus neutralization test (VNT) and interferon measurements.

### 2.2. Monitoring Histopathological Changes in Organs of MNV-Infected Mice

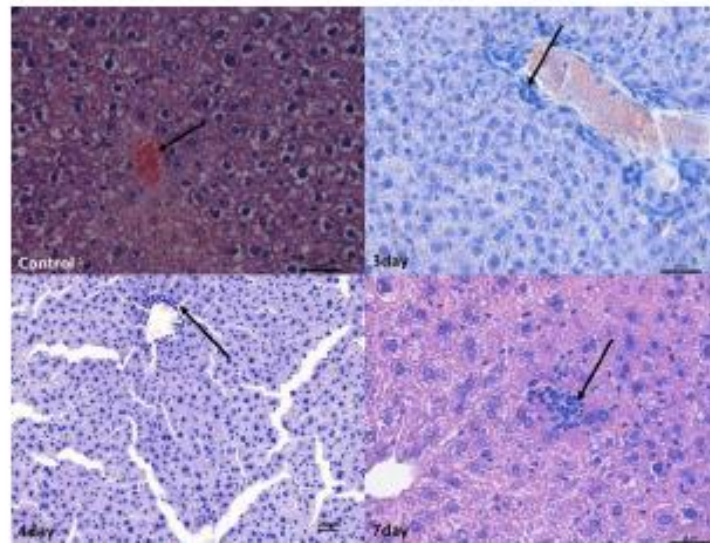
Despite the fact that tissue sections were taken from the small and large intestine, pancreas, liver, heart, lungs, kidneys, and brain fragments (forebrain, midbrain) after 3, 4, and 7 days of norovirus incubation, similar changes were found in the liver and brain in all individuals studied. In the other organs, there were either no changes (small and large intestine, pancreas, heart) or individual changes independently of the length of virus incubation (lungs, kidneys).

In the lung and kidney, small perivascular infiltrates within the blood vessels compared to a normal picture were observed. As infiltrates were found in the subcapsular zone as well as in the cortex and medulla of the kidney and in the lungs surrounding the bronchioles in the control group, it was decided not to consider changes in these organs as caused by the virus (Figure 1).



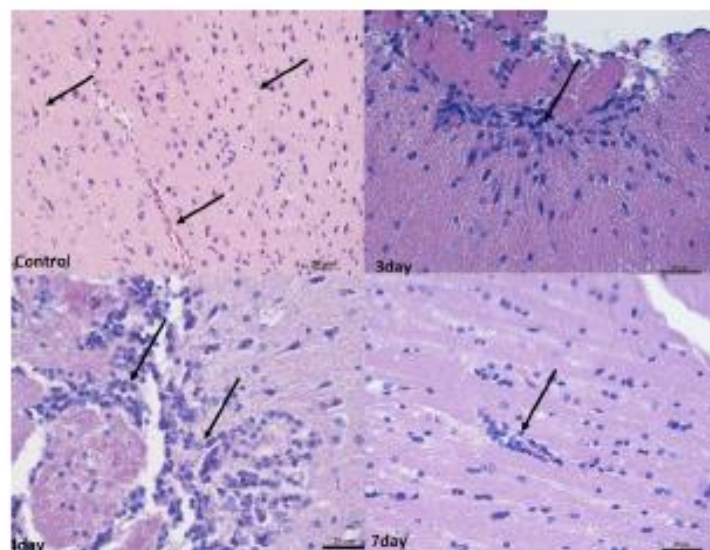
**Figure 1.** Histopathological changes in the lungs and kidneys. Lungs: Example pictures of lymphocyte infiltration in the control group and on the 3rd day. Note the presence of lymphoreticular tissue present (arrow) next to the bronchiole in the control group as well as in the alveoli on the 3rd day. Similar changes were found in individuals from other groups. Mag 100 $\times$ . Kidneys: Example pictures of lymphocyte infiltration in animals on the 3rd, 4th, and 7th days. Mild lymphocyte infiltration (arrow) under the kidney capsule and between proximal tubules on the 4th day. Similar changes were observed in other time periods and in the control group. Fourth day—Mag 200 $\times$ , seventh—Mag 400 $\times$ . Scale bar—control and 7th day—25  $\mu$ m, scale bar—3rd and 4th days—100  $\mu$ m. These changes were considered not to be associated with norovirus.

In the liver, perivascular infiltrates were present surrounding both the hepatic triads and intralobular vessels. In the lobules, they often surrounded single hepatocytes; however, no features of necrosis or apoptosis were found. In the liver, numerous binucleated hepatocytes were present in all experimental groups, which, however, indicated enhanced repair processes (Figure 2).



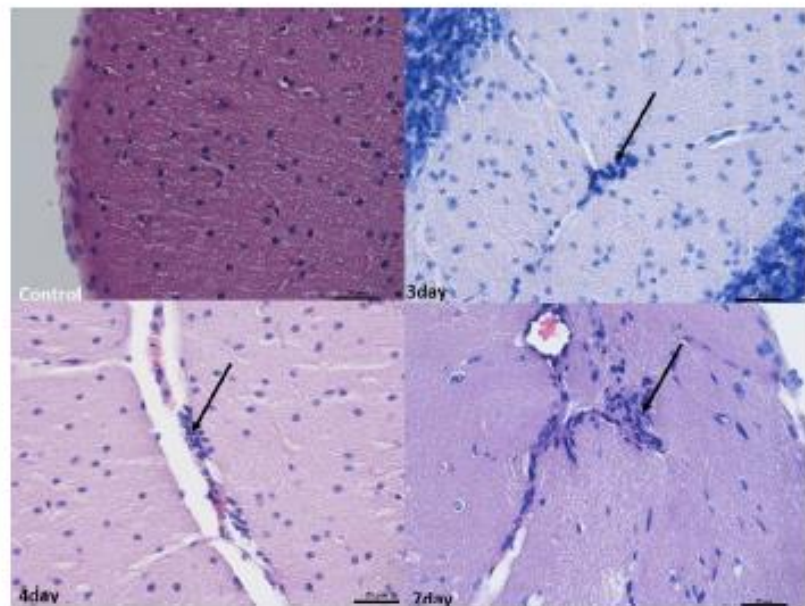
**Figure 2.** Histopathological changes in the liver. Control group—normal structure of hepatocytes surrounding the central vein (arrow). Mag 400 $\times$ . Mild lymphocyte infiltration around the blood vessel (arrow) after 3rd (Mag 400 $\times$ ) and 4th days. ((Mag 200 $\times$ ). After the 7th day, lymphocyte infiltration in the hepatic stroma (arrow). Mag 400 $\times$ . Scale bar—25  $\mu$ m.

In the brain, infiltrates were localized in the meningeal vessels within the cerebellum and midbrain, mostly in white matter and pia mater. No such infiltrates were found in the forebrain. The infiltrates were often accompanied by edema, giving the white matter a foam-like character (Figures 3 and 4).



**Figure 3.** Histopathological changes in the midbrain. Control group—numerous blood vessels in the midbrain (arrow). Mag 200 $\times$ . After 3rd and 4th days—perivascular infiltration of lymphocytes in the white matter (arrow). Mag 400 $\times$ . (D) after the 7th day, mild perivascular lymphocyte infiltration in white matter (arrow). Mag 400 $\times$ . Scale bar—25  $\mu$ m.





**Figure 4.** Histopathological changes in the cerebellum. Control group—normal image of unaltered cortex covered with pia matter. Mag 400 $\times$ . On the 3rd day, 4th day, and 7th day—perivascular infiltration of lymphocytes in the white matter (arrow). Mag 400 $\times$ . Scale bar—25  $\mu$ m.

At 4 and 7 days after infection, the changes were broadly similar. Although there was less swelling in the cerebellum 7 days after infection compared to 3 days after infection, there were also lower levels of blood present in the vessels in the organs. In addition, an increased number of small infiltrates was observed in the liver and brain compared to 3 days post-infection. Nevertheless, no increased apoptosis or necrosis was observed in the organs examined (Figures 1–4).

### 2.3. Oxidative Stress Markers

We found statistically significant differences in SOD, MnSOD, GST, GPx, GR, and CAT activities, TAC and TOS levels, and MDA concentration between the sampled tissues in the control and norovirus-infected mice (Table 1).

We found higher SOD activity in the liver tissue of control mice when comparing it in individual tissues between the control and norovirus-infected mice (Table 1). Similarly, we found statistically significant differences in MnSOD activity when comparing it in individual tissues between the control and norovirus-infected mice. We observed higher MnSOD activity in the liver, but lower MnSOD activity in the kidney tissues of the control mice (Table 1). Further comparisons within individual tissues showed higher GR concentrations in the brain, cerebellum, and liver tissues of the norovirus-infected mice compared to control mice. We observed higher GR activity in the lung and kidney tissues of the control mice compared to norovirus-infected mice (Table 1). Comparisons within individual tissues showed higher CAT activity in the cerebellum, lung, and kidney tissues of the norovirus-infected mice compared to control mice. We observed increased CAT activity in the liver of the control mice compared to the norovirus-infected ones. (Table 1).

**Table 1.** Levels of oxidative stress markers in the brain, cerebellum, liver, lung, and kidney tissues collected from all control ( $n = 7$ ) and norovirus-infected mice euthanized 7 days after inoculation ( $n = 7$ ). Results are presented as median with lower and upper quartiles (Me (Q1–Q3)).

Oxidative Stress Marker	Group	Brain	Cerebellum	Liver	Lungs	Kidney	<i>p</i>
SOD (NU/mg protein)	control	11.1 (9.0–14.1)	15.0 (11.6–18.9)	3.6 (3.3–4.8)	4.1 (2.5–5.7)	5.4 (4.8–6.8)	<0.001
	norovirus	12.0 (11.2–13.4)	15.0 (11.5–15.5)	2.7 (2.4–2.8)	4.9 (3.2–6.3)	5.9 (5.0–6.1)	<0.001
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	0.443	0.443	<0.01	0.523	0.701	
MnSOD (NU/mg protein)	control	3.1 (2.1–4.1)	2.5 (1.4–3.7)	2.4 (2.2–2.9)	2.6 (2.3–3.0)	1.9 (1.8–2.0)	<0.05
	norovirus	2.7 (2.6–3.0)	2.6 (2.3–2.8)	2.0 (1.9–2.2)	2.6 (2.2–2.8)	2.2 (2.1–2.4)	<0.01
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	0.609	0.609	<0.05	0.701	<0.05	
GR (IU/g protein)	control	26.6 (25.7–28.0)	26.8 (24.9–27.5)	5.7 (5.4–7.4)	13.5 (12.4–15.9)	1.8 (1.5–2.4)	<0.001
	norovirus	15.4 (15.0–17.8)	21.9 (19.3–22.6)	0.3 (0.2–0.3)	18.3 (17.8–18.4)	3.6 (2.6–4.7)	<0.001
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	
CAT (IU/g protein)	control	184.1 (141.2–187.7)	133.2 (108.1–147.1)	396.4 (382.7–437.5)	140.3 (133.4–144.3)	290.8 (264.3–298.1)	<0.001
	norovirus	154.0 (117.6–179.8)	193.5 (186.3–238.9)	225.6 (204.1–247.3)	180.8 (166.1–187.7)	358.2 (355.0–374.5)	<0.001
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	0.250	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
GPx (IU/g protein)	control	446 (257–535)	488 (413–522)	65 (60–69)	496 (485–530)	270 (208–401)	<0.001
	norovirus	309 (271–358)	256 (205–373)	135 (113–150)	389 (384–399)	250 (245–270)	<0.001
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	0.201	<0.01	<0.01	<0.01	0.443	
GST (IU/g protein)	control	6.4 (6.2–7.0)	8.1 (6.8–8.8)	3.9 (3.1–4.6)	6.2 (5.2–7.6)	5.6 (5.2–6.6)	<0.001
	norovirus	6.5 (5.4–6.8)	7.5 (6.4–9.6)	5.9 (4.7–7.5)	6.4 (8.9–7.0)	8.1 (5.1–5.2)	<0.05
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	0.609	1.0	<0.01	0.798	0.196	
TAC (mmol/g protein)	control	0.34 (0.32–0.38)	0.41 (0.38–0.46)	0.32 (0.31–0.36)	0.26 (0.22–0.27)	0.33 (0.32–0.44)	<0.001
	norovirus	0.43 (0.41–0.53)	0.16 (0.14–0.18)	0.18 (0.11–0.24)	0.25 (0.21–0.34)	0.47 (0.44–0.48)	<0.001
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	<0.01	<0.01	<0.01	0.256	0.070	
TOS (IU/g protein)	control	0.45 (0.29–0.53)	0.46 (0.43–0.56)	0.40 (0.38–0.46)	2.48 (2.20–2.76)	0.62 (0.60–0.71)	<0.001
	norovirus	0.74 (0.67–0.90)	0.55 (0.51–0.59)	0.87 (0.86–1.07)	1.97 (1.54–2.14)	0.43 (0.40–0.46)	<0.001
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	<0.01	0.097	<0.01	0.055	<0.01	
MDA (IU/g protein)	control	7.1 (6.5–8.2)	14.3 (13.5–15.1)	2.9 (2.8–3.6)	3.3 (3.1–3.8)	2.7 (2.1–3.2)	<0.001
	norovirus	7.2 (6.7–8.4)	12.1 (11.2–12.3)	2.4 (2.1–2.6)	3.7 (3.2–4.6)	3.1 (2.8–3.8)	<0.001
	$P_{\text{control vs. norovirus}}$	0.898	0.055	<0.05	0.523	0.246	

Abbreviations: CAT—catalase activity; GPx—glutathione peroxidase activity; GR—glutathione reductase activity; GST—glutathione S-transferase; MDA—malondialdehyde concentration; MnSOD—Mn superoxide dismutase activity; SOD—superoxide dismutase; TAC—total antioxidative capacity; TOS—total oxidative status. Green indicates biochemical analysis results showing an increase relative to the control. Biochemical analysis results showing a decrease relative to the control are highlighted in red. *p*—statistical significance ( $p \leq 0.05$ ).

When comparing GPx activity in individual tissues between control and norovirus-infected animals (Table 1), we found higher GPx activity in the cerebellum and lungs of control mice, as well as in the liver tissue of norovirus-infected mice. Additionally, this comparison revealed higher GST activity in the liver of norovirus-infected mice (Table 1). Furthermore, we observed higher TAC levels in brain tissue but lower levels in the cerebellum and liver tissues of norovirus-infected mice compared to control mice. Conversely, we

noted higher TOS levels in the brain and liver, but lower TOS levels in the kidney tissues of norovirus-infected mice compared to controls. Finally, concentrations of MDA were higher in the liver tissue of control mice compared to norovirus-infected mice.

### 3. Discussion

The present study was designed to investigate how MNV infection affects oxidative stress and histological changes in mice.

It is known that MNV infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by a STAT1-dependent interferon response [21]. Interferon gamma, along with other type I and III interferons, has previously been shown to play a role in limiting MNV macrophage infection [22].

We and others have used several inbred strains of mice as hosts for MNV infection [1,23,24]. But, since most of the genetically engineered mouse strains are from the C57Bl/6 genetic background, in this report, we decided to use this host strain. Moreover, a direct comparison of MNV-associated diarrhea in C57Bl/6 and Balb/c mice showed that both strains are comparably susceptible [25]. In our project, we also considered the use of different MNV strains. In studies of the pathogenesis of this virus in mice, the authors usually use MNV-1.CW 1, MNV-1.CW 3, and MNV-4, -5, and -6. These strains induce histopathological changes in many organs in some experiments, while in other studies, these changes are weak or not noted at all. This depends on many factors—the immunocompetence of the animals, their age, and, finally, the dose of virus [26]. Mumphrey et al. [27], comparing MNV-1.CW 3 and CW 1, reported that the MNV-1.CW 3 strain, being more virulent than CW 1, caused more severe histopathological changes. However, these studies, as well as those of other authors [5], do not apply to the neural tissue in which we wanted to demonstrate lesions. In a publication by Karst et al. [5], such changes were obtained using purified MNV-1 from IFN $\alpha\beta\gamma$ R $^{-/-}$  mouse brains. To obtain similar changes, we chose the MNV-1.CW1 (ATCC) strain of the same origin. Here, we also analyzed oxidative stress markers, which were tissue dependent, suggesting variation in oxidative stress associated with viral pathogenesis.

In the study by Hsu et al. [28], MNV-infected mice were analyzed for histopathological changes in various groups, including naturally MNV-infected mice; wild-type mice experimentally infected with MNV; immunodeficient mice experimentally infected with MNV; mice in gastrointestinal disease models experimentally infected with MNV; and mice in other disease models experimentally infected with MNV. Some naturally MNV-infected mice showed histopathological changes in the liver, lungs, mesenteric lymph nodes, lungs, and spleen. In some wild-type mice experimentally infected with MNV, histopathological changes occurred in the liver, small intestines, and spleen. In the histopathological examination of immunodeficient mice experimentally infected with MNV, changes were observed in the liver, lungs, small intestine, and spleen, and in the case of *Rag2 $^{-/-}$* , *STAT1 $^{-/-}$* , and *Ifn $\alpha\beta\gamma$ R $^{-/-}$*  mice, changes were observed in the brain. Some mice in gastrointestinal disease models experimentally infected with MNV exhibited histopathological changes in mesenteric lymph nodes, small and large intestines, the spleen, and the stomach. In the case of some mice in other disease models experimentally infected with MNV, changes were observed in mesenteric lymph nodes and the aorta [29]. In our experiment, no severe changes in examined organs were found except mild lymphocyte infiltrations in the brain and liver without visible cell damage [21].

In fact, some of the most common causes of encephalitis are viral infections. Several viral agents have been described to cause this condition, such as arboviruses, rhabdoviruses, enteroviruses, herpesviruses, retroviruses, orthomyxoviruses, orthopneumoviruses, and coronaviruses, among others. However, MNV was not treated as an agent that can cause encephalitis [30].

The present study also showed that the enzymatic and non-enzymatic markers of oxidative stress were tissue dependent. Viral infection caused depletion of most of the assessed enzymes like SOD, MnSOD, CAT, and GR in liver tissue compared to the control

mice, whereas the GPx and GST activities measured in liver tissue were significantly higher in the norovirus-infected mice. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione-dependent enzymes, such as GPx, are the most important antioxidant enzymes. Superoxide dismutases, like total SOD and MnSOD, are enzymes that catalyze the conversion of superoxide into  $O_2$  and  $H_2O_2$ . Catalase catalyzes the conversion of  $H_2O_2$  into  $H_2O$  and  $O_2$ , and GPxs catalyze the conversion of  $H_2O_2$  or hydroperoxides to  $H_2O$  and alcohols while oxidizing GSH to GSSG. Reactive oxygen species' role during viral infections may be unclear and may depend on how they are produced [31]. The activity of MnSOD was higher in the kidney tissue of the norovirus-infected mice when compared to control ones. The activity of GR was lower in all the studied tissues in norovirus-infected mice except for lung tissue. It is known that the activities and concentration of the selected antioxidative enzymes change during viral infection or different stages of infection. A study conducted on an in vitro model reported that during the first hours after infection, SOD, GST, CAT, and GPx were the main antioxidative enzymes induced in response to the infection [32]. As the infection progressed, only SOD concentration increased, leading to increased  $H_2O_2$  production, whereas other antioxidant enzymes decreased, including those that are critical for neutralizing  $H_2O_2$  [33].

The body's overall oxidative state is typically estimated using the total oxidant status (TOS), whereas the body's overall antioxidant level is determined by total antioxidant capacity (TAC) [34]. Other studies showed that TOS levels clearly increase with the aggravation of the COVID-19 disease, since the elevated level of oxidative stress has the capability to intensify the severity of COVID-19. Karkhanei et al. reported that serum TOS level, one of the oxidative stress biomarkers, was higher in patients with acute SARS-CoV-2 presentation. The authors showed that serum TOS levels in infected COVID-19 patients were related to other important factors, such as fever, hospitalization longer than one week, residency, educational status, and job type, and indirectly related to SpO<sub>2</sub> (oxygen saturation). In the present study, the selected non-enzymatic antioxidative and oxidative parameters such as TOS, TAC, and MDA changed after the norovirus infection, depending on the analyzed tissue. Nevertheless, noroviral infection resulted in increased TOS levels in the brain and liver and increased TAC levels in brain tissues, while TOS levels were significantly decreased in the kidneys. The decrease in TAC may lead to reduced body resilience and ultimately to increased mortality [35]. The presented results prove that oxidative stress markers change rapidly depending on the conditions of the external environment. Selected evidence suggests that ROS overproduction and antioxidant system depletion play a significant role in the pathogenesis of viral infections and in the progression of the disease severity.

With high levels of oxidative stress in target organs including the brain, liver, kidney, and lung, oxidative stress plays a crucial role in a number of pathological disorders. We believe that this shows a strong connection between oxidative stress levels and the specific functions of each organ. Multiple intracellular signaling pathways are known to be activated by oxidative stress, resulting in subsequent organ failure. Targeting oxidative stress is thus thought to be useful in preventing organ damage, and assessing the level of oxidative stress may act as a biomarker in a variety of disease conditions. Here, we understand that the selected virus may have varied effects and, thus, create varying stresses in different organs—depending on the location of inflammation, the severity of the infection, and the corresponding immune response—which may also be influenced by other factors. In order to support this hypothesis further, biomolecular studies have to be performed.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Mice

Animal experimentation was carried out under permission no. 022/2022 from the Local Ethical Committee in Wrocław, Poland. Mice were housed in individually ventilated cages and fed with standard sterilized rodent chow and water ad libitum. The specific pathogen-free, hygienic status of the animal facility is maintained by periodic sentinel

screening according to FELASA recommendations. All measures were taken to minimize the number of animals in procedures and their suffering.

The study material consisted of healthy and norovirus-infected mice, which were divided into 4 study groups:

1. Healthy controls (control);
2. Euthanized 3 days after infection (3 days);
3. Euthanized 4 days after infection (4 days);
4. Euthanized 7 days after infection (7 days).

The method used to euthanize mice was cervical dislocation. Before the procedure, the mice were placed in the induction chamber of a veterinary anesthesia workstation (Équipement Vétérinaire Minerve, Esternay, France). The isoflurane flow was set to 2.5%. Two minutes after the mice were fully premedicated, they were transferred to pads with an inhalation mask and the anesthetic administration was continued. With a firm grip, placing the index finger and thumb directly behind the skull, and with the other hand grabbing the tail just at the base, one strong movement led to the dislocation of the cervical vertebrae. Pulling was continued until the skull was felt to be completely unattached to the spine. Each time, breathing stopped within a few seconds of the dislocation. Before starting the necropsy procedure, mice were decapitated.

#### 4.2. Monitoring the Kinetics of MNV-1 Infection in C57Bl/6J Mice

The amount of virus in the suspension to be administered to the experimental animals was tested by RT-PCR. C57Bl/6J mice were infected per os with 50 microliters of MNV1 suspension ( $100\text{TCID}_{50}$ ) on day 0. Mice were kept in isolation under specific pathogen-free (SPF) conditions to prevent accidental infection with another pathogen. After MNV was experimentally administered to the animals, a repeat RT-PCR test was performed after euthanasia. We used an indirect interferon gamma (IFN $\gamma$ ) test and a virus neutralization test to ascertain comparable MNV infection and antibody levels between individual mice.

#### 4.3. Cell Culture

In vitro experiments were conducted using RAW 264.7 macrophage cells (TIB-7™, ATCC, Manassas, VA, USA). These cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with nonessential amino acids and 10% fetal bovine serum (FBS), obtained from Biological Industries (Kibbutz Beit-Haemek, Israel). The cell cultures were maintained in 25 mL polystyrene flasks (Googlab Scientific, Rokocin, Poland) and incubated at 37 °C in a controlled environment with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. Passage of the cells was carried out using 0.25% trypsin-EDTA (Biological Industries).

#### 4.4. Virus Propagation

Murine norovirus (ATCC, Los Angeles, CA, USA, VR-1973) was used for this project. When the RAW 264.7 (TIB-7™, ATCC, Manassas, VA, USA) cells reached 75–80% confluence, the cell culture medium was removed, and the cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, the virus was introduced into the flask and allowed to incubate for 3 h under conditions of 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Following this incubation, the virus suspension was removed, and the cell culture was washed again with PBS. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) was then added, and the cells were subjected to further incubation for a period of 4 to 6 days. Daily observations were carried out using an inverted microscope (Olympus Corp., Hamburg, Germany; Axio Observer, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Munich, Germany) to monitor the development of cytopathic effects (CPEs). Norovirus was titrated using a TCID<sub>50</sub> (50% Tissue Culture Infectious Dose) assay and then stored in a freezer at –80 °C.

#### 4.5. Histological Examination

For histopathological evaluation, small and large intestine, pancreas, liver, heart, lung, kidney, and brain fragments (forebrain, midbrain) were taken from all animals. The

material was fixed in a solution of 4% buffered formalin (pH 7.2–7.4) for 48 h and then dehydrated in an alcoholic series after washing in tap water. The material was then embedded in paraffin. The 6  $\mu\text{m}$  thick sections were stained with hematoxylin and eosin. The material was analyzed in a Nikon Eclipse 80i light microscope using NisElements Ar software: <https://www.microscope.healthcare.nikon.com/products/software/nis-elements/nis-elements-advanced-research>, accessed on 1 June 2023 (Nikon, Tokyo, Japan).

#### 4.6. Oxidative Stress

Seven days after viral inoculation, we harvested 100 mg of selected tissues: brain, cerebellum, liver, lungs, and kidneys from the infected animals ( $n = 7$ ) and put it in 1 mL of a homogenizing buffer with protease inhibitors. The tissues were homogenized (1:10  $w/v$ ) in 0.9% NaCl with a glass homogenizer (Potter-Elvehjem PTFE, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and then sonicated (Virsonic 100, VirTis, Gardiner, NY, USA). The tissue samples were then frozen and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , until the analysis.

For this study, organs were taken from all control ( $n = 7$ ) and infected mice were euthanized 7 days after inoculation ( $n = 7$ ).

##### 4.6.1. Superoxide Dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) Activity

Total SOD activity was measured using the Oyanagui method [35]. In this method, xanthine oxidase catalyzes the production of superoxide anion that reacts with hydroxylamine to produce nitroso ions. The latter combined with *n*-(1-naphthyl)ethylenediamine and sulfanilic acid gives a color combination that can be measured spectrophotometrically. The SOD and *mn*SOD activities were determined using the Oyanagui method [35]. The SOD activities were expressed in NU/mg of protein, with 1 NU (nitrate unit) equal to 50% inhibition of nitrite ion formation.

##### 4.6.2. Catalase (CAT) Activity (EC 1.11.1.6)

CAT activity was assessed using the Aebi method [36]. In this method, the homogenate is mixed with perhydrol in 50 mM TRIS/HCl buffer, pH 7.4, and the reaction is started by adding freshly prepared hydrogen peroxide. The rate of decomposition of hydrogen peroxide can be measured spectrophotometrically at 240 nm. CAT activity is expressed as units per 1 g protein (IU/g protein).

The CAT activity was determined using the Aebi method [36] and expressed as units per 1 g protein (IU/g protein).

##### 4.6.3. Glutathione Peroxidase (GPx) Activity (EC 1.11.1.9)

GPx activity was measured by using the kinetic method [37], with *t*-butyl peroxide as a substrate. In this reaction, oxidized glutathione (GSSG) is regenerated in the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH. GPx activity was expressed as  $\mu\text{moles}$  of NADPH oxidized in 1 min per 1 g of protein (IU/g protein) for selected tissues.

The GPx activity was measured using the kinetic method [37] with *t*-butyl peroxide as a substrate and is expressed as  $\mu\text{moles}$  of oxidized NADPH in 1 min per 1 g of protein (IU/g protein).

##### 4.6.4. Glutathione Reductase (GR) Activity (EC 1.8.1.7)

GR activity was determined by using the kinetic method and is expressed as  $\mu\text{moles}$  of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) utilized in 1 min per 1 g of protein (IU/g protein) for assessed samples [38]. This method is based on changes in the concentration of NADPH that reacts with oxidized glutathione. The changes in absorbance at 340 nm were measured with a PERKIN ELMER Victor X3 reader (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA).

The GR activity was determined using the kinetic method [38] and expressed in  $\mu\text{moles}$  of NADPH utilized in 1 min by 1 g of protein (IU/g protein).

#### 4.6.5. Glutathione-S Transferase (GST) Activity (EC 2.5.1.18)

GST activity was estimated using the Habig and Jakoby kinetic method [39]. The reaction mixture containing reduced glutathione was added to the samples. After initial stabilization, 1-chloro-2,3-dinitrobenzene (in ethyl alcohol solution) was added, and absorbance changes were monitored using a PERKIN ELMER Victor X3 reader, at 340 nm wavelength, for at least 3 min. GST activity was expressed as  $\mu$ moles of thioether formed within 1 min per 1 g of protein (IU/g protein).

#### 4.6.6. Total Oxidant Status (TOS) and Total Antioxidant Capacity (TAC)

The total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) levels were determined using the Erel methods [40,41]. TOS was determined using the methodology provided by Erel based on a system containing xylene orange, *o*-dianisidine, and  $\text{Fe}^{2+}$  ions [35]. The determination of TAC in serum was based on the method of decolorization of oxidized ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiaz-6-sulfonate)) under the influence of antioxidants occurring in the tested material [35].

#### 4.6.7. Malondialdehyde (MDA) Concentration

The malondialdehyde (MDA) concentration was measured using a reaction with thiobarbituric acid [42], calculated from a standard curve prepared with 1,1,3,3-tetraethoxypropane, and expressed in  $\mu\text{mol/g}$  protein.

#### 4.6.8. Statistical Analysis of Antioxidant Stress Markers

The normality of distributions was assessed using the Shapiro–Wilk test. Kruskal–Wallis ANOVA was used for comparisons in the study and norovirus groups depending on the type of tissue. Within a single tissue, comparisons between the study group and the control group were made using the Mann–Whitney U test. The median (lower–upper quartile) (Me (Q1–Q3)) was used in the description. The tests performed were two-sided and the significance level was set at 0.05. The calculations were performed in the TIBCO Statistica<sup>®</sup> 13.3.0 program (data analysis software system), (TIBCO Software Inc., Santa Clara, CA, USA), accessed on 15 September 2023.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.J., P.K., D.S., A.M. and B.B.; methodology, P.J., D.S., P.K., A.M. and B.B.; investigation, P.J., P.K., A.M., A.S. and B.B.; data curation, E.C.; writing—original draft preparation, P.J., D.S., P.K., A.M., A.P. and B.B.; writing—review and editing, P.J., D.S., P.K., A.M., A.P., K.P. and B.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The article is part of a PhD dissertation titled “Development of a diagnostic kit for the detection of noroviruses in biological and environmental samples. Prevalence and epidemiological significance of noroviruses”, prepared during Doctoral School at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences. Project No. DWD/4/12/2020. The APC is financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Local Ethics Committee in Wrocław (protocol code 022/2022/P2 and date 30 September 2022 of approval).

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the large number of results, which would affect the clarity of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** Authors Paulina Janicka and Katarzyna Pala were employed by the company FoodFuture Technologies Ltd. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

1. Tsikas, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* **2017**, *524*, 13–30. [[CrossRef](#)]
2. Fernandes, I.G.; de Brito, C.A.; Dos Reis, V.M.S.; Sato, M.N.; Pereira, N.Z. SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses: What Does Oxidative Stress Have to Do with It? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 8844280. [[CrossRef](#)]
3. Buesa, J.; Collado, B.; Lopez-Andujar, P.; Abu-Mallouh, R.; Rodriguez Diaz, J.; Garcia Diaz, A.; Prat, J.; Guix, S.; Llovet, T.; Prats, G.; et al. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 2854–2859. [[CrossRef](#)]
4. Green, K.Y. Caliciviridae: The noroviruses. In *Fidds Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 582–608.
5. Karst, S.M.; Wobus, C.E.; Lay, M.; Davidson, J.; Virgin, H.W., 4th. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **2003**, *299*, 1575–1578. [[CrossRef](#)]
6. Hsu, C.C.; Wobus, C.E.; Steffen, E.K.; Riley, L.K.; Livingston, R.S. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **2005**, *12*, 1145–1151. [[CrossRef](#)]
7. Kahan, S.M.; Liu, G.; Reinhard, M.K.; Hsu, C.C.; Livingston, R.S.; Karst, S.M. Comparative murine norovirus studies reveal a lack of correlation between intestinal virus titers and enteric pathology. *Virology* **2011**, *421*, 202–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Strong, D.W.; Thackray, L.B.; Smith, T.J.; Virgin, H.W. Protruding domain of capsid protein is necessary and sufficient to determine murine norovirus replication and pathogenesis in vivo. *J. Virol.* **2012**, *86*, 2950–2958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kim, J.R.; Seok, S.H.; Kim, D.J.; Baek, M.W.; Na, Y.R.; Han, J.H.; Kim, T.H.; Park, J.H.; Turner, P.V.; Chung, D.H.; et al. Prevalence of murine norovirus infection in Korean laboratory animal facilities. *J. Vet. Med. Sci.* **2011**, *73*, 687–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Pritchett-Corning, K.R.; Cosentino, J.; Clifford, C.B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab. Anim.* **2009**, *43*, 165–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Muller, B.; Klemm, U.; Mas Marques, A.; Schreier, E. Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 1709–1719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Henderson, K.S. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice. *Lab. Anim.* **2008**, *37*, 314–320. [[CrossRef](#)]
13. Kitajima, M.; Oka, T.; Tohya, Y.; Katayama, H.; Takeda, N.; Katayama, K. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan. *Microbiol. Immunol.* **2009**, *53*, 531–534. [[CrossRef](#)]
14. Kelmenson, J.A.; Pomerleau, D.P.; Griffey, S.; Zhang, W.; Karolak, M.J.; Fahey, J.R. Kinetics of transmission, infectivity, and genome stability of two novel mouse norovirus isolates in breeding mice. *Comp. Med.* **2009**, *59*, 27–36.
15. McFadden, N.; Bailey, D.; Carrara, G.; Benson, A.; Chaudhry, Y.; Shortland, A.; Heeney, J.; Yarovinsky, E.; Simmonds, P.; Macdonald, A.; et al. Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002413. [[CrossRef](#)]
16. Basic, M.; Keubler, L.M.; Buettner, M.; Achard, M.; Breves, G.; Schröder, B.; Smoczek, A.; Jörns, A.; Wedekind, D.; Zschemisch, N.H.; et al. Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 431–443. [[CrossRef](#)]
17. Cecchini, R.; Cecchini, A.L. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. *Med. Hypotheses* **2020**, *143*, 110102. [[CrossRef](#)]
18. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* **2012**, *70*, 257–265. [[CrossRef](#)]
19. Ntyong'a-Pono, M.P. COVID-19 infection and oxidative stress: An under-explored approach for prevention and treatment? *Pan Afr. Med. J.* **2020**, *35* (Suppl. S2), 12. [[CrossRef](#)]
20. Kazura, W.; Michalczyk, K.; Skrzep-Poloczek, B.; Chelmecka, E.; Zalejska-Fiolka, J.; Michalski, M.; Kukla, M.; Jochem, J.; Rutkowski, J.; Stygar, D. Liver Oxidative Status, Serum Lipids Levels after Bariatric Surgery and High-Fat, High-Sugar Diet in Animal Model of Induced Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16535. [[CrossRef](#)]
21. Kurutas, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr. J.* **2015**, *15*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Maloney, N.S.; Thackray, L.B.; Goel, G.; Hwang, S.; Duan, E.; Vachharajani, P.; Xavier, R.; Virgin, H.W. Essential cell-autonomous role for interferon (IFN) regulatory factor 1 in IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of norovirus replication in macrophages. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12655–12664. [[CrossRef](#)]
23. Balmus, I.M.; Ciobica, A.; Antioch, I.; Dobrin, R.; Timofte, D. Oxidative stress implications in the affective disorders: Main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 25. [[CrossRef](#)]
24. Abedi, A.; Ghojati, H.; Sharghi, A.; Iranpour, S.; Fazlzadeh, M.; Aslani, M.R. Effect of saffron supplementation on oxidative stress markers (MDA, TAC, TOS, GPx, SOD, and pro-oxidant/antioxidant balance): An updated systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1071514. [[CrossRef](#)]



25. Mumphrey, S.M.; Changotra, H.; Moore, T.N.; Heimann-Nichols, E.R.; Wobus, C.E.; Reilly, M.J.; Moghadamfalahi, M.; Shukla, D.; Karst, S.M. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3251–3263. [[CrossRef](#)]
26. Roth, A.N.; Helm, E.W.; Mirabelli, C.; Kirsche, E.; Smith, J.C.; Eurell, L.B.; Ghosh, S.; Altan-Bonnet, N.; Wobus, C.E.; Karst, S.M. Norovirus infection causes acute self-resolving diarrhea in wild-type neonatal mice. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2968. [[CrossRef](#)]
27. Dycke, J.V.; Neyts, J.; Rocha-Pereira, J. Assessing the Efficacy of Small Molecule Inhibitors in a Mouse Model of Persistent Norovirus Infection. *Bio-Protocol* **2018**, *8*, e2831. [[CrossRef](#)]
28. Taube, S.; Kolawole, A.O.; Höhne, M.; Wilkinson, J.E.; Handley, S.A.; Perry, J.W.; Thackray, L.B.; Akkina, R.; Wobus, C.E. A mouse model for human norovirus. *mBio* **2013**, *4*, e00450-13. [[CrossRef](#)]
29. Peiper, A.M.; Helm, E.W.; Nguyen, Q.; Phillips, M.; Williams, C.G.; Shah, D.; Tatum, S.; Iyer, N.; Grodzki, M.; Eurell, L.B.; et al. Infection of neonatal mice with the murine norovirus strain WU23 is a robust model to study norovirus pathogenesis. *Lab. Anim.* **2023**, *52*, 119–129. [[CrossRef](#)]
30. Hsu, C.C.; Piotrowski, S.L.; Meeker, S.M.; Smith, K.D.; Maggio-Price, L.; Treuting, P.M. histologic Lesions Induced by Murine Norovirus Infection in Laboratory Mice. *Vet. Pathol.* **2016**, *53*, 754–763. [[CrossRef](#)]
31. Wobus, C.E.; Thackray, L.B.; Virgin IV, H.W. Murine Norovirus: A Model System to Study Norovirus, Biology and Pathogenesis. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5104–5112. [[CrossRef](#)]
32. Bohmwald, K.; Andrade, C.A.; Gálvez, N.M.S.; Mora, V.P.; Muñoz, J.T.; Kalergis, A.M. The Causes and Long-Term Consequences of Viral Encephalitis. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, 758875. [[CrossRef](#)]
33. Marrocco, I.; Albieri, E.; Peluso, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 6501046. [[CrossRef](#)]
34. Garofalo, R.P.; Kolli, D.; Casola, A. Respiratory syncytial virus infection: Mechanisms of redox control and novel therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 186–217. [[CrossRef](#)]
35. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 277–285. [[CrossRef](#)]
36. Karkhaneh, B.; Talebi Ghane, E.; Mehri, F. Evaluation of oxidative stress level: Total antioxidant capacity, total oxidant status and glutathione activity in patients with COVID-19. *New Microbes New Infect.* **2021**, *42*, 100897. [[CrossRef](#)]
37. Oyanagui, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **1984**, *142*, 290–296. [[CrossRef](#)]
38. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126.
39. Mannervik, B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 490–495. [[CrossRef](#)]
40. Carlberg, I.; Mannervik, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 484–490. [[CrossRef](#)]
41. Erel, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem* **2005**, *38*, 1103–1111. [[CrossRef](#)]
42. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Cite this: *RSC Adv.*, 2024, **14**, 6028

## Sensitive electrochemical gold nanoparticle-based immunosensor for norovirus detection in food samples

Paulina Janicka,<sup>†</sup><sup>ab</sup> Sylwia Baluta,<sup>b</sup>\*<sup>c</sup> Juliusz Winiarski,<sup>d</sup> Kinga Halicka-Stępień,<sup>c</sup> Aleksandra Pogorzelska,<sup>a</sup> Joanna Cabaj,<sup>b</sup> Katarzyna Pala<sup>b</sup> and Barbara Bażanów<sup>a</sup>

Norovirus (NoV) infection is one of the most common non-bacterial causes of gastroenteritis among the population worldwide. From the point of view of medical diagnostics, it is important to develop a system that would sensitively and selectively detect norovirus from a patient's sample in order to control and limit its spread. In this paper, we present a stable and sensitive NoV (mouse model) detection matrix in infected food samples. The bio-platform was made of a modified gold electrode with a self-assembled L-cysteine monolayer, covered with gold nanoparticles, a linker and an antibody specific to the VP1 surface protein of the virus. Binding of the VP1 protein to the antibody caused a decrease in the current strength confirmed by electrochemical techniques – cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry. The reduction of the current was proportional to the concentration of NoV sample. The biosensors showed high sensitivity and linearity in a range from  $1 \times 10^{-9}$  to  $1 \times 10^{-18}$  TCID<sub>50</sub> with the detection limit of  $1 \times 10^{-18}$  TCID<sub>50</sub>. CV showed a diffusion-controlled process. In addition, each modification step was confirmed by scanning electron microscopy, electrochemical impedance spectroscopy, and CV. The described immunosensor showed excellent recovery values, good linearity and long-term stability, crucial parameters for biosensor construction.

Received 15th December 2023  
Accepted 12th February 2024

DOI: 10.1039/d3ra08586d

rsc.li/rsc-advances

<sup>a</sup>Department of Pathology, University of Environmental and Life Sciences in Wrocław, Narwińska 31, 50-375 Wrocław, Poland

<sup>b</sup>FoodFuture Technologies Sp. z o.o., ul. Turasa Szewczeni 24, 51-351 Wrocław, Poland

<sup>c</sup>Institute of Advanced Materials, Wrocław University of Science and Technology, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland. E-mail: sylwia.baluta@pwr.edu.pl

<sup>d</sup>Group of Surface Technology, Department of Advanced Material Technologies, Wrocław University of Science and Technology, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, Wrocław 50-370, Poland

<sup>e</sup>Water Science and Technology Institute-H<sub>2</sub>O SciTech, ul. Turasa Szewczeni 24, 51-351 Wrocław, Poland

<sup>†</sup> PhD Student in the 4th Edition of the Implementation Doctorate Programme—Ministry of Education and Science.

Paulina Janicka, MSc, holds a Biology degree with a focus on laboratory techniques from the University of Life Sciences in Wrocław. Since 2019, she's pursued a PhD at the Faculty of Veterinary Medicine, concentrating on norovirus biology and occurrence. Her doctoral work centers on creating a swift norovirus detection method for various samples. Presently, she's employed at Food for Future Technologies (formerly Fish Farm Solutions), contributing to the development of rapid pathogen detection tests for salmon and shrimp. Paulina Janicka has co-authored a scientific publication and holds a patent.

## 1. Introduction

The global pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has demonstrated an urgent need for non-invasive, fast, and cheap diagnostic methods for emerging pathogens.<sup>1</sup> Norovirus (NoV) is one of the main aetiological agents of viral gastroenteritis, causing 685 million cases and 210 000 deaths each year.<sup>2,3</sup> Norovirus infection is caused by a low amount of the virus (c.a. 100 copies per mL), and currently, there is no vaccine nor anti-noroviral agents, while the most common source of infection are basic diet ingredients, such as fruit, vegetables, and seafood.<sup>4,5</sup> Considering that it spreads easily and commonly contaminates food samples, a biosensor which could sensitively and selectively detect NoV is desirable.

Sylwia Baluta, PhD, graduated in Biotechnology and Medicinal Chemistry in 2014, followed by a PhD from Wrocław University of Science and Technology in 2021. Her research focuses on developing biosensors for neurotransmitters, hormones, and viruses through electrochemical and optical methods using nanoparticles like graphene quantum dots (GQDs) and semi-conductive polymers. She has co-authored 15 publications, holds 6 patents, and contributed to patent declarations. Sylwia Baluta honed her skills through research internships with Food for Future Technologies (formerly Fish Farm Solutions) and at the University of Sassari, Italy, working with Prof. Maria Pilo.



Electrochemical immunosensors demonstrate unparalleled advantages over traditional techniques, prominently characterized by their superior properties. First and foremost, these innovative sensors allow for efficient miniaturization, enhancing portability, a crucial aspect that facilitates their broader applicability.<sup>20</sup> Their inherent cost-effectiveness, when

compared to conventional counterparts, positions electrochemical biosensors as a practical and economically viable solution for diagnostic applications. Additionally, the heightened sensitivity of electrochemical immunosensors deserves explicit attention. This distinctive feature allows for the accurate detection of target analytes even at low concentrations, a critical capability, especially in scenarios like norovirus infections where the viral load is relatively minimal. Furthermore, the compatibility of electrochemical immunosensors with various matrices and their versatility in accommodating diverse biomolecules contribute to their significance. These sensors can be tailored to specific applications, offering a flexible platform for the detection of a wide array of analytes.<sup>13,22</sup>

The future of medical diagnostics, particularly in the detection of viral diseases, may relate to innovative biosensors. One of the promising elements used in the bioreceptor layer is antibodies, due to their high specificity towards the analyte to be detected.<sup>23</sup> The basic factor in the fabrication of an electrochemical immunosensor is a proper preparation of a chemically modified electrode by the immobilization of a biologically active compound, an antibody, on its surface. One of the commonly used strategies is the covalent binding based on strong, covalent interactions between the surface of the modified electrode and the functional groups of the antibody, as it creates more stable and better oriented immunosensing platforms.<sup>24–26</sup> Since bare electrodes do not possess proper sites for covalent bonding, it is crucial to successfully modify their surface to prepare it for protein anchoring. For this purpose, some reagents can be applied, such as glutaraldehyde, carbodiimide succinimide ester, or *N*-hydroxysuccinimide.<sup>27</sup> Another often used strategy is the application of the self-assembled monolayer (SAM) method to obtain functionalized thin film rich in groups desired for the antibody immobilization.<sup>28,29</sup> The result is the formation of highly organized SAMs due to semi-covalent binding between a sulfide group (e.g. thiols) and the noble metal surfaces (e.g. Au). Thiol functionalized antibodies possess high affinity to Au surfaces, and therefore they can be easily immobilized.<sup>30</sup>

In the advancement of electrochemical immunosensing strategies, enhancing signal amplification, sensitivity, and stability emerges as pivotal for optimizing immunosensor performance. Signal amplification within electrochemical

---

*Juliusz Winiarski, PhD, DSc, is a Associate Professor in Department of Advanced Material Technologies at Wrocław University of Science and Technology (WUST), Wrocław, Poland. Prof. Winiarski received his MSc (2008) and PhD (2012) from WUST. After habilitation (2020) he is currently serving as a head of the Group of Surface Technology. His recent research are the modern electroplating, industrial corrosion problems, coatings and electrochemistry.*

*Kinga Halicka-Stepień, MSc, is a graduate of Pharmaceutical Biotechnology at Wrocław University of Science and Technology. Since 2019, she has been a PhD Student at the Faculty of Chemistry of Wrocław University of Science and Technology, where her research concerns the application of nanomaterials in enzymatic detection systems for the electrochemical determination of neurotransmitters.*

*Aleksandra Pogorzelska, MSc, is a graduate in Microbiology at the University of Wrocław, Wrocław, Poland. As of 2019, she is an employee of the Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Life Sciences, Wrocław, Poland. She conducts research in classical and molecular virology with a special focus on the family Adenoviridae.*

*Joanna Cabaj, PhD, DSc, earned her PhD in organic chemistry in 2005 and habilitated in biotechnology in 2012 at Wrocław University of Science and Technology, Poland. She currently serves as a professor at the Faculty of Chemistry there. Her research focuses on developing semiconducting materials for molecular electronics and sensors, with a specialization in thin Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer films for gas sensors and molecular biosensors. Joanna Cabaj has co-authored over 70 publications, numerous book chapters, and holds more than 40 patents. Her work combines organic chemistry and sensor technology to advance materials for various applications.*

*Katarzyna Pala, PhD, is a Biotechnology graduate from Wrocław University of Science and Technology (2008) who completed her PhD at the University of Wrocław in 2014 and engaged in an intellectual property venture at Jagiellonian University in Kraków. She underwent an extensive internship at the University of Wollongong. Currently, she serves as the Co-Founder and CEO of Food for Future Technologies (formerly Fish Farm Solutions). Additionally, she holds the position of Chair of the Board of Directors at the Water Science and Technology Institute in Wrocław. Food for Future Technologies, a Polish-Norwegian startup, specializes in sustainable food production, adhering to circular economy principles. Dr Katarzyna Pala has authored scientific publications and patents.*

*Barbara Bażanów, PhD, MVD, is an associate professor in the Department of Microbiology at Wrocław University of Environmental and Life Sciences, specializing in topics such as abortogenic viruses in horses, cytotoxicity of chemical compounds and plant extracts, epidemiological studies in various animal species, viral infections' impact on oxidative stress markers, graphene oxide and nanoceria toxicity, adenovirus 36-induced obesity, and noroviruses. She's actively involved in various research projects and grants, holds memberships in the Polish Society of Veterinary Sciences, and the Expert Group on Veterinary Medicinal Products. With over 40 scientific publications, she's contributed to successive editions of the Polish Pharmacopoeia.*

immunosensors can be effectively realized through the incorporation of *e.g.* nanomaterials.<sup>21</sup>

To additionally enhance important working parameters of an electrochemical immunosensor, semi-conductive properties need to be improved. Commonly, it is achieved by the application of semi-conductive materials to the electrode surface. Nowadays, considerable focus has been devoted to nanomaterials, which could be applied in biosensors due to their exquisite sensitivity in chemical and biological sensing.<sup>22</sup> A wide range of nanomaterials could be applied in the biosensor systems, however gold nanoparticles (AuNPs) have received great interest due to their many beneficial characteristics, such as high surface-to-volume ratio or high surface energy, which allow for a stable immobilization of biomolecules with simultaneous retention of their bioactivity.<sup>23–26</sup> Additionally, they permit fast and direct electron transfer between a broad range of electrochemically detected analytes and electrode surface.<sup>27</sup>

In this study, we present an electrochemical biosensor consisting of a self-assembled monolayer on a gold electrode, modified with gold nanoparticles, a linker, and an antibody specific for the VP1 protein of norovirus based on a murine model. Scanning electron microscopy (SEM), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), as well as cyclic voltammetry (CV) were applied for the visualization of each step of electrode preparation. The novelty of presented research lies in the preparation of a new, very stable matrix for the NoV detection, which could be used as a biorecognition part in a biosensory device. Differential pulse voltammetry was used for the NoV detection and characterization of the immunosensor working parameters, such as linearity, sensitivity, selectivity, and accuracy. Described immunosensor is distinguished by good stability obtained by properly performed modification of the electrode surface, which gave very promising results in possible application as a future point-of-care device.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

L-Cysteine (Cys), gold nanoparticles (diameter 20 nm, stabilized suspension in citrate buffer), protein crosslinker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), amine-reactive crosslinker *N*-hydroxysuccinimide ester (NHS), anti-norovirus (MNV-1) mouse monoclonal antibody, clone 5C4.10, Cat. No. MABP2097, 0.10 mg mL<sup>-1</sup> (Ab), bovine serum albumin (BSA), norovirus, ferrocyanide, and glutaraldehyde (GA) were purchased from Sigma-Aldrich Co (Merck company). Sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), citric acid (CA), NaOH, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HCl, and CH<sub>3</sub>COOH were purchased from Chempur. NaCl, KCl, and CH<sub>3</sub>COONa were purchased from POCH (Part of Avantor, Performance Materials, Poland). Tris was purchased from Roche. All chemicals were of analytical grade and were used without any further purification. All buffers were prepared according to generally known, obligatory standards. Fruits, vegetables, and oysters for analysis in the food samples were obtained from the Selgros store. Bacteria: *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella* spp., *E. faecalis*, were obtained courtesy of Prof. Jarosław Król from the Department

of Pathology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland.

### 2.2. Preparation of virus samples

**2.2.1 Cell culture.** *In vitro* experiments were carried out using macrophage cells RAW (TIB-7, ATCC) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with non-essential amino acids with addition of 10% of fetal bovine serum (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel), cultures were maintained in Starsted culture flasks (25 mL) at 37 °C in an incubator supplied with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air humidity. When the cells reached confluence of 90%, they were split using 0.25% trypsin-EDTA and distributed evenly into new flasks.

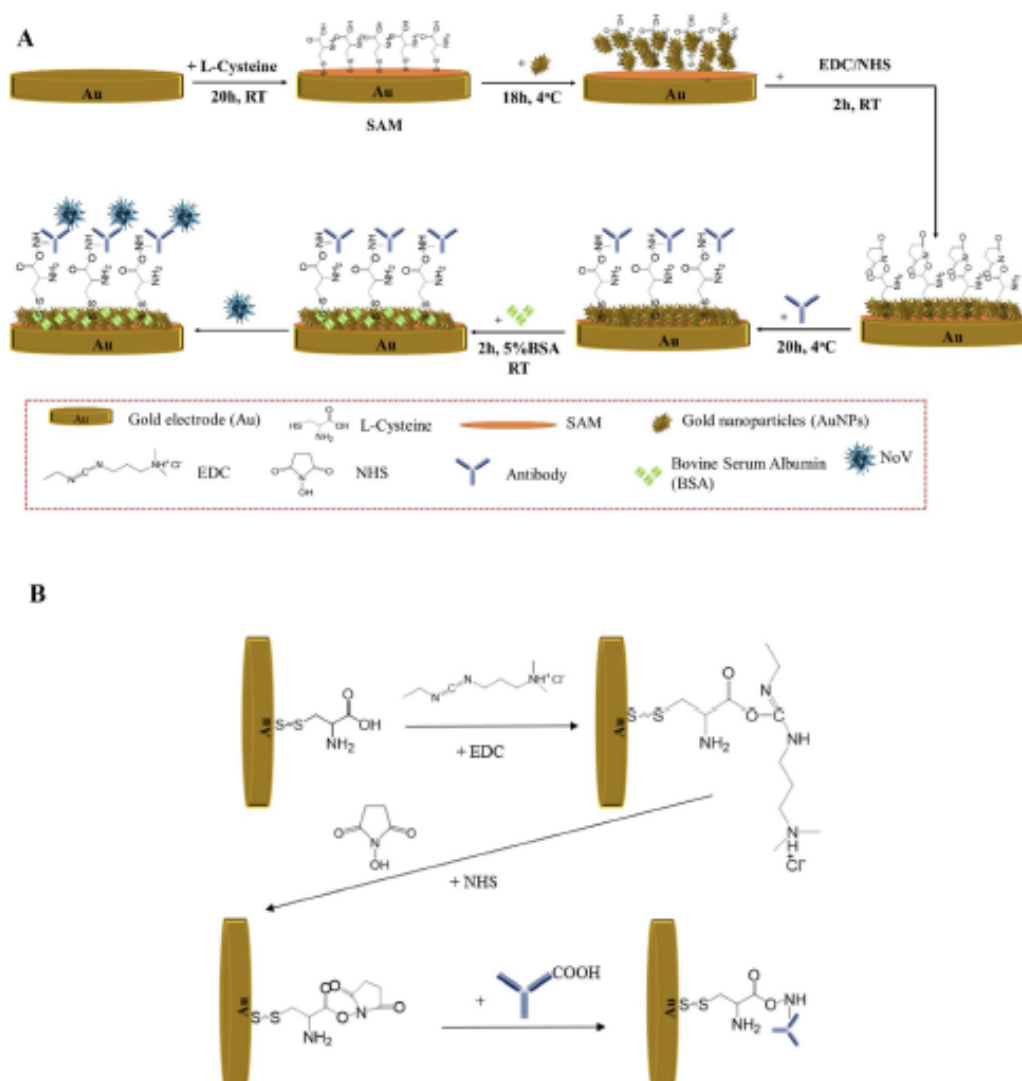
**2.2.2 Virus propagation.** The virus used in the study was Murine Norovirus (VR-1973, ATCC) replicated in RAW cells. When the culture reached the confluence of 75–80%, the medium was removed, and the cells were washed with PBS solution with calcium and magnesium ions. After that, 3 mL of virus suspension was added to the flask. Cells with virus were incubated for 3 h at 37 °C in an incubator with 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, virus suspension was removed, cell culture was washed with PBS and DMEM was added. Cells were incubated for 4 to 6 days and observed daily for the development of cytopathic effect (CPE) using inverted microscope (Olympus Corp., Hamburg, Germany; Axio Observer, Carl Zeiss Microimaging GmbH).

### 2.3. Preparation of samples for accuracy studies

The white food matrices were selected based on specific criteria, taking into consideration factors such as potential susceptibility to norovirus contamination. The selection process aimed to encompass a variety of food items commonly associated with norovirus outbreaks. The chosen matrices included: Bilberry (*Vaccinium* L.), Lettuce (*Lactuca sativa* L.), Raspberry (*Rubus idaeus* L.), and Edible Oyster (*Ostrea edulis*) fished in France and the Netherlands. This materials were taken (5 mm × 5 mm), finely minced with a scalpel, and suspended in a measuring buffer, to which 100 µL of norovirus (1 × 10<sup>-8</sup> TCID<sub>50</sub>) was added. A sample of each pathogen causing symptoms similar to norovirus infection (*Bacterococcus faecalis*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) at a concentration of 1.5 × 10<sup>-8</sup> CFU, was mixed 1:1 with the virus.

### 2.4. Apparatus

Electrochemical measurements – cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were performed using a potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT 128N with NOVA software at room temperature. Electrochemical measurements were carried out using a three-electrode system consisting of the modified and unmodified gold electrode (AuE, diameter 1.6 mm, produced by BASI, MF-2014 model) as the working electrode, an Ag|AgCl (sat. KCl) as a reference electrode, and a platinum wire as a counter electrode. Impedance spectra were recorded in a separate experiment using Gamry Interface 1010E potentiostat. A 50 mL volume electrochemical cell (BE H-Cell from redox.me) was used, containing working electrode (AuE, diameter 1.6 mm, produced by BASI, MF-2014 model, 0.018 cm<sup>2</sup> geometric area exposed to the



**Fig. 1** (A) Schematic preparation of the immunosensor for the NoV determination; (B) proposition of the chemical groups involved in the process of creating a stable matrix.

solution), the Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode and platinum coil as a counter electrode. Equivalent circuit modeling was performed in ZView (SAL) software. Visualization and characterization of each step of the AuE modification was carried out with FEI Quanta 250 SEM microscope equipped with SDD Octane Elect Plus EDS detector. SEM imaging was performed in SE (secondary electron) mode with accelerating voltage of 5 kV under  $10^{-4}$  Pa pressure. Sample tilt of  $\alpha$  70° and dynamic focus were used to reflect better surface morphology and topography. Real time reverse

transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied for the isolation of the genetic material. The commercial Total RNA Maxi kit (A&A Biotechnology, Poland) was used to isolate the genetic material from the samples used in the study. A CFX Connect Bio-Rad thermocycler was used for the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) reaction. The commercial SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step kit (BIO-76005) (BLIRT, Poland) was used. For the identification of the genetic material, the following primers and probe were used based on literature.<sup>28</sup>

MNV-F CCGCAGGAACGCTCAGCAG

MNV-R GGYTGAATGGACGGCCTG

MNV-TR1 FAM-ATGAGTGATGGCGCA

The qPCR reaction conditions were as follows: 10 min at 45 °C and 2 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 5 s at 95 °C and 20 s at 55 °C.

### 2.5. Fabrication of the immunosensor

Preparation of the immunosensor for the detection of NoV was a multistep fabrication process and is presented in Fig. 1. Firstly, AuE was polished with diamond powder (diameter 3 μm), rinsed in ethanol and deionized water, and dried at room temperature to remove dusts and impurities from its surface. The activation of the gold electrode was performed using 0.5 M sulfuric acid for 60 cycles with a cyclic voltammetry method (potential range 0–1.4 V, until a stable voltammogram was obtained). In the first step of the proper modification, the AuE was immersed in 0.05 M L-cysteine and incubated for 20 h to spontaneously form a self-assembled monolayer, creating a film rich in thiol groups. L-cysteine is rich in S-atom which interacts with Au-atom from electrode through Au–S binding, it has high affinity to the Au NPs as well. Next, 40 μL of gold nanoparticles were dropped onto the AuE/SAM electrode and incubated for 18 h at 4 °C. During the next step, 20 μL EDC/NHS was added onto the surface for 2 h at RT. Application of EDC/NHS results in the creation of a well-oriented monolayer and allows a better antibody/antigen interaction.<sup>27</sup> The last step was the immobilization of the antibody, which was diluted 1 : 5000, according to the literature,<sup>28</sup> and 20 μL was dropped onto the AuE/SAM/AuNPs/EDC/NHS electrode for 20 h at 4 °C. Since the amide bond created between the amino group of the NHS and the carboxyl group of the protein is strong, the antibody does not detach from the electrode surface during measurements. In the end, 0.5% bovine serum albumin (BSA) was incubated on the electrode surface area for 2 h to block inactive groups and non-specific binding sites. The detection was based on the specificity of the virus surface protein VP1 to the antibody.

The electrode was rinsed with 0.1 M PBS (pH 7.0) and 10 mM pH 8.0 Tris–HCl buffers for 10 minutes each and with deionized water after each step of the modification process to wash unbound molecules from the electrode surface and remove impurities or any cross-linker byproducts.

Each step of the modification was checked using CV and EIS analysis. SEM was adopted for the visualization of the surface of the gold electrode after modification. Prepared electrode was stored at 4 °C when not in use.

### 2.6. Electrochemical procedure of the norovirus analysis

A typical three-electrode 10 mL cell, including the above-mentioned gold working electrode, platinum counter electrode, and Ag|AgCl reference electrode, was used for the CV and DPV measurements. The CV method was applied for the

visualization of each step of the electrode modification towards 5 mM ferro/ferricyanide redox couple in 0.1 M KNO<sub>3</sub> (as the supporting electrolyte). The CV scans were recorded in a potential range from –0.4 V to 0.6 V vs. Ag|AgCl electrode for 3 cycles each, at a scan rate of 50 mV s<sup>–1</sup>. In addition, potentiostatic EIS was performed at open circuit potential ( $E_{OC}$ ) in 0.1 M KNO<sub>3</sub> (supporting electrolyte) solution containing 5 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3–/4–</sup> (1 : 1) with a resolution of 10 pts per dec in a frequency range from 100 kHz to 0.01 Hz and ac signal of 10 mV (rms).

For the characterization of the immunosensor's working parameters, the differential pulse voltammetry technique was used. DPV for a range of dilutions (10<sup>–1</sup>–10<sup>–10</sup>) of the NoV (1 × 10<sup>–8</sup> TCID<sub>50</sub> – tissue culture infective dose) was performed in the potential range of 0–0.6 V vs. Ag|AgCl and with the amplitude of 50 mV. To test the immunosensor's ability to work in open-air conditions and at room temperature, all electrochemical measurements were performed under such conditions. Samples of the NoV in the concentration range of 1 × 10<sup>–9</sup> to 1 × 10<sup>–18</sup> TCID<sub>50</sub> were prepared by serially diluting norovirus samples in 0.1 M PBS buffer at pH 7.0 containing 0.1 M KCl (supporting electrolyte).

### 2.7. Accuracy and stability tests

Common food samples coming from lettuce, bilberry, raspberry, and oysters (from France and Holland) and samples from widespread bacterial pathogens (*E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella* spp., *E. faecalis*) prepared as described in Section 2.3, were infected with the NoV and studied for the accuracy of described immunosensor. Mentioned species were mixed each time with the NoV solutions in a volume ratio of 1 : 1. DPV analysis was then applied in the potential range of 0–0.6 V vs. Ag|AgCl and signals were compared to the one obtained from the NoV sample.

The stability test of the immunosensor was conducted 2 weeks after the electrode preparation using the CV analysis with AuE/SAM/AuNPs/EDC/NHS/Ab/BSA in the presence of 5 mM ferro/ferricyanide redox couple in 0.1 M KNO<sub>3</sub> for 60 cycles in a potential range of –0.4–0.6 V vs. Ag|AgCl reference electrode with the scan rate of 50 mV s<sup>–1</sup>.

### 2.8. Ethical statement

This research did not involve human or animal samples.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of the electrochemical and microscopic changes during the construction of the immunosensor

The multi-step process of the electrode modification was characterized by SEM, EIS, and CV. The immobilization of the agents on the electrode surface was confirmed after each step.

SEM was used to monitor the changes in surface morphology after each modification step. The first step led to the formation of SAMs with a fairly diverse morphology, i.e. the surface was dotted with spheroidal and randomly distributed clusters (few micrometers in size) embedded in the L-cysteine layer (Fig. 2a).

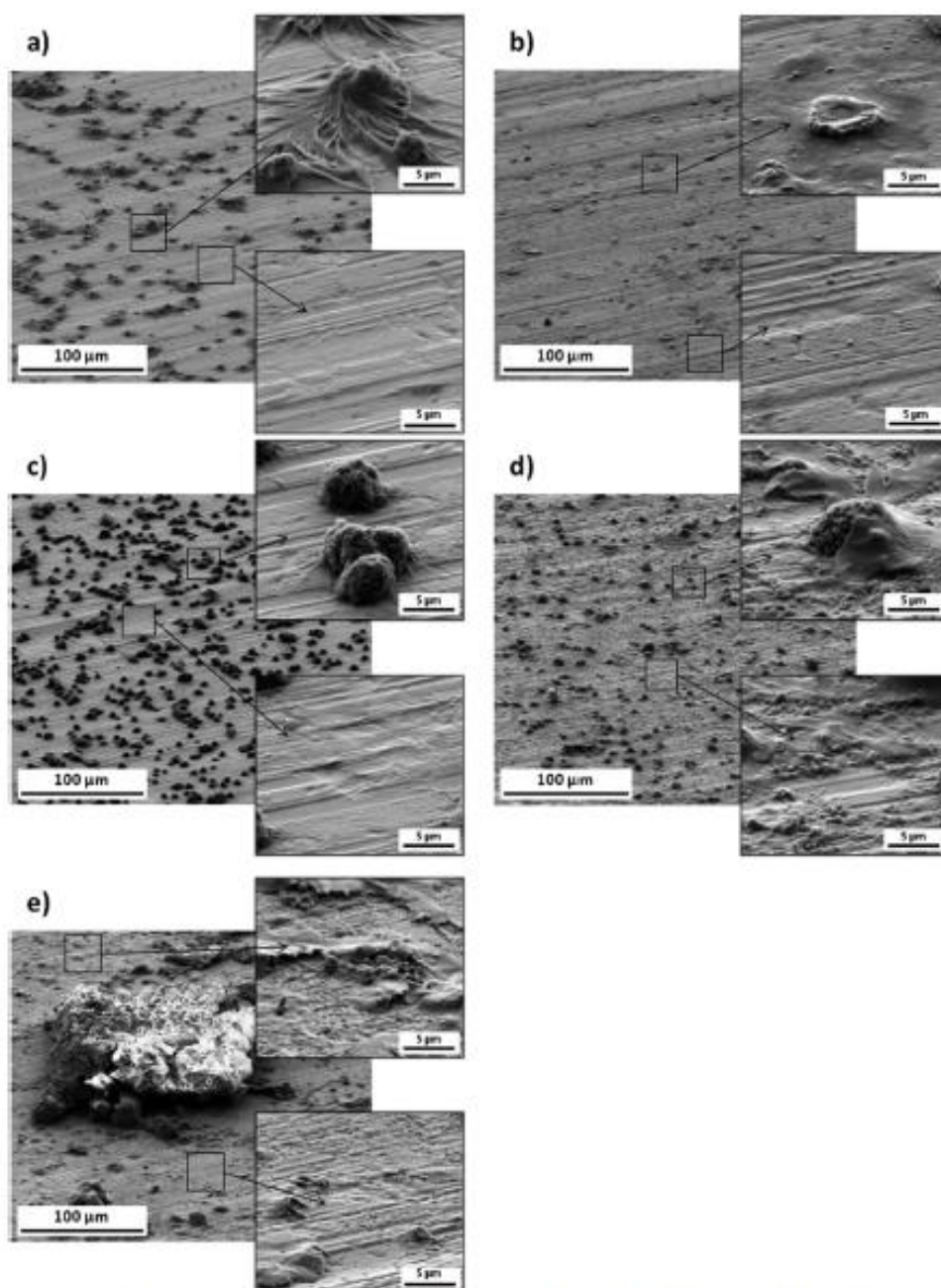


Fig. 2 SEM images of surface morphology of the electrode modified with: SAM (a), AuNPs (b), SAM/AuNPs (c), SAM/AuNPs/EDC/NHS (d), SAM/AuNPs/EDC/NHS/antibody (e).

For comparison, the AuNPs deposited on the raw gold substrate formed a generally uniform layer with scattered very fine agglomerates and relatively large and flat clusters with

a diameter of several micrometers (Fig. 2b). Combining these two steps together resulted in a denser, than in Fig. 2a, surface coverage with several micrometer nodules with a flocculent and

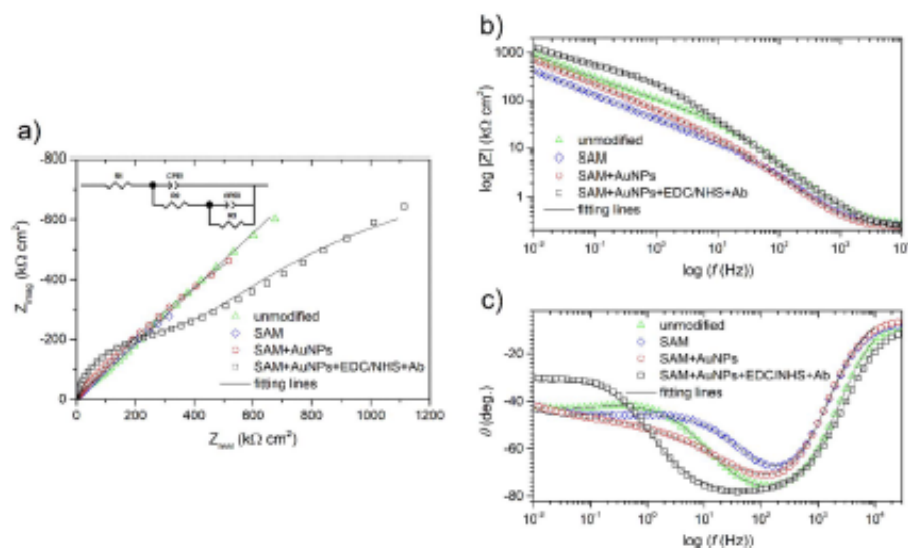


Fig. 3 Nyquist (a) and Bode (b and c) representations of the impedance spectra recorded for unmodified and modified gold electrodes at  $E_{OC}$  after 30 min of exposure in a solution of 0.1 M  $KNO_3$  with 5 mM  $[Fe(CN)_6]^{3-4-}$ . Solid fitting lines refer to Model 2 from Fig. 4b.

(probably) porous structure (Fig. 2c). Addition of EDC/NHS layer caused that the surface after SAM/AuNPs modification was covered with a quite differentiated layer (Fig. 2d). Namely, the nodules were covered (the smaller ones) or partially embedded (the larger ones) in a fairly smooth and continuous EDC/NHS layer. Outside the EDC/NHS clusters, the layer was discontinuous, of varying thickness, and granular in structure (Fig. 2d). Immobilization of the antibody (Fig. 2e) resulted in fine granularity in places where the EDC/NHS layer was the thinnest. In addition, few, flat clusters with sizes exceeding 100 micrometers were visible – probably formed after dropping the antibody onto the surface.

Impedance spectra recorded for all samples with a modified surface are characterized by a similar shape that slightly differs from that of unmodified Au electrode (Fig. 3a–c). In the Nyquist plot (Fig. 3a), one time constant can be distinguished in the medium frequency range. A further increase in impedance, starting from a few Hz towards mHz, can be interpreted in two ways. On the one hand, it may be a fragment of the second semicircle. On the other hand, this fragment is almost perfectly inclined (for the first three samples only) at an angle of  $45^\circ$  and may indicate the existence of diffusion constraints. Regardless of the interpretation, the impedance characteristics are similar (in shape) to those in the literature.<sup>28–31</sup> While the presence of a second time constant is hard to see on the Nyquist plot (Fig. 3a), the second maximum of the phase angle could be found on the Bode plot at about 0.1 Hz (Fig. 3c). It is especially visible for the electrodes after modification. Apart from that, all samples reach rather high impedances (Fig. 3b).

The use of the simplest model with one time constant containing an open Warburg element connected in series after the

resistor was initially considered (Fig. 4a). In this circuit the physical sense of the elements could be as follows:  $R_1$  – electrolytic solution resistance,  $CPE_1$  and  $R_2$  – the capacitance and resistance of the charge transfer reaction,  $W_o$  – Warburg diffusion element, where:  $R$  reflects diffusion impedance,  $T$  reflects time of diffusion of the particle through layer thickness and  $P$  is the  $W_o$  exponent.

Quite good fit (chi square ca.  $4.3 \times 10^{-2}$ – $2.5 \times 10^{-4}$ ) and low residual errors were obtained. Fitting results, shown only for exploratory and illustrative purposes, are summarized in Table 1, without delving into the physical meaning of the elements.

Fitting was repeated, but the circuit was modified to the one consisting of two time constants connected in parallel (Fig. 4b). Using this physical model, the best fit (chi square ca.  $3–9 \times 10^{-2}$ ) and low residual errors were obtained in this work. Fitting results are summarized in Table 2, and the fitting lines visible

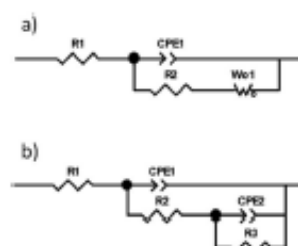


Fig. 4 Electric equivalent circuits used for fitting the experimental impedance spectra recorded for both modified (a) and unmodified (b) gold electrodes.



Table 1 Fitting results for impedance spectra recorded on modified and unmodified Au electrodes in 0.1 M  $\text{KNO}_3$  with 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  solution obtained for a model from Fig. 4a<sup>a</sup>

Sample	$R_1$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$\text{CPE}_{1-T}$ ( $\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^p$ )	$\text{CPE}_{1-P}$	$R_2$ ( $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ )	$W_{\sigma-R}$	$W_{\sigma-T}$	$W_{\sigma-P}$
AuE	269 (0.7)	$4.90 \times 10^{-7}$ (0.8)	0.93 (0.1)	44.77 (1.5)	$2.79 \times 10^6$ (4.5)	164 (9.7)	0.49 (0.3)
AuE + SAM	254 (0.5)	$7.49 \times 10^{-7}$ (3)	0.94 (0.4)	7.44 (4)	$1.16 \times 10^6$ (4.5)	118 (9.6)	0.51 (0.3)
AuE + SAM + AuNPs	238 (0.5)	$7.89 \times 10^{-7}$ (3.8)	0.94 (0.5)	8.01 (10)	$1.95 \times 10^6$ (4.3)	124 (9.5)	0.49 (0.3)
AuE + SAM + AuNPs + Ab	226 (0.7)	$6.10 \times 10^{-7}$ (1)	0.90 (0.2)	304.9 (3.6)	$3.42 \times 10^6$ (32)	268 (81)	0.49 (2.3)

<sup>a</sup> Values in brackets are the % error.

Table 2 Fitting results for impedance spectra recorded on modified and unmodified Au electrodes in 0.1 M  $\text{KNO}_3$  with 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  solution obtained for a model from Fig. 4b<sup>a</sup>

Sample	$R_1$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$\text{CPE}_{1-T}$ ( $\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^p$ )	$\text{CPE}_{1-P}$	$R_2$ ( $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ )	$\text{CPE}_{2-T}$ ( $\Omega^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^p$ )	$\text{CPE}_{2-P}$	$R_3$ ( $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$ )
AuE	269 (0.3)	$4.94 \times 10^{-7}$ (0.9)	0.93 (0.1)	45.95 (1.9)	$4.35 \times 10^{-6}$ (0.3)	0.50 (0.6)	27.5 (22)
AuE + SAM	252 (0.8)	$8.14 \times 10^{-7}$ (1.8)	0.93 (0.2)	8.98 (2.3)	$9.49 \times 10^{-6}$ (0.7)	0.53 (0.4)	2.91 (6)
AuE + SAM + AuNPs	237 (0.2)	$8.46 \times 10^{-7}$ (1.5)	0.94 (0.2)	11.24 (3.7)	$5.32 \times 10^{-6}$ (0.2)	0.51 (0.3)	5.04 (4.6)
AuE + SAM + AuNPs + Ab	224 (0.2)	$6.29 \times 10^{-7}$ (0.5)	0.90 (0.1)	377.2 (1.5)	$3.89 \times 10^{-6}$ (1.9)	0.60 (1.9)	2.49 (5.5)

<sup>a</sup> Values in brackets are the % error.

on Nyquist and Bode plots in Fig. 3a–c are related directly to these results. In this circuit, the physical sense of the elements was adopted, according to <sup>30–32</sup>, as follows:  $R_1$  – electrolytic solution resistance,  $\text{CPE}_1$  and  $R_2$  – the frequency response of the charge transfer process, while  $\text{CPE}_2$  and  $R_3$  – the frequency response of the diffusion process. Normally, if  $P = 0.8–0.9$ , then  $\text{CPE}_2$  would describe some real capacitance. However, here  $P \sim 0.5$  so this constant phase element behaves rather like a Warburg element. This assumption is supported by the previous fitting using the circuit from Fig. 4a.

Table 2 shows that the deposition of SAM layer reduced the resistance of  $R_2$  five times, below  $10 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ , but more importantly, reduced the resistance  $R_3$  by almost one order of magnitude. If one associates  $R_2$  with electron transfer and  $R_3$  with diffusion constraints, then their large decrease would confirm that one has achieved the goal of this sub-step of modification. The next step, the deposition of AuNPs on the surface, caused only a slight increase in both resistances (Table 2). It can therefore be confirmed that surface functionalization with gold nanoparticles also facilitates electron transfer between detected analytes and Au electrode surface, in accordance with the literature.<sup>33</sup> A significant change was caused by the immobilization of the antibody. Although  $R_2$  has increased more than thirty times,  $R_3$  remained at a low level, in the order of  $2.5 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$  (Table 2). This means that although the electron transfer resistance has increased (because the antibody inhibited electron transfer), the diffusion constraints have decreased slightly. In addition, the  $\text{CPE}_{1-P}$  parameter slightly decreased, which would suggest greater heterogeneity (distribution of reaction rates) within the surface. All these findings would confirm that the antibodies have been successfully grafted onto the surface of the modified electrode.

Using this physical model, a CV was also used to characterize the gold electrode after each assembly step. As can be observed in Fig. 5, the cyclic voltammogram of ferri/ferrocyanide redox

couple demonstrated reversible behavior on a bare Au electrode, with a peak-to-peak separation of c.a. 30 mV (Fig. 5, gold curve). When AuE was modified by the immobilization of SAM and AuNPs onto its surface, the peak current increased noticeably (Fig. 5, green curve) because of an exquisite electron transfer performance of AuNPs.<sup>33</sup> As expected, the immobilization of the biorecognition element for the NoV detection (the antibody) onto the electrode surface caused a current signal decrease, with peak-to-peak separation c.a. 60 mV (Fig. 5, black curve). The covalent assembly of the antibody onto the electrode could form a closely packed film which passivates the electrode, hindering the transfer of electrons between the redox probe and the electrode. This phenomenon was observed in numerous other studies.<sup>30,33,34</sup>

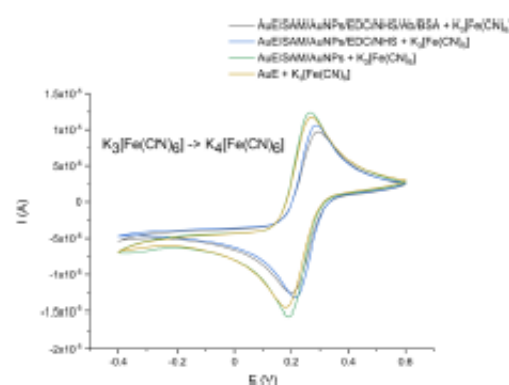


Fig. 5 CV voltammogram presenting the preparation of the electrochemical immunosensor for the NoV detection to 5 mM ferri/ferrocyanide redox probe,  $\text{KNO}_3$  used as a supporting electrolyte; potential range:  $-0.4–0.6 \text{ V}$ ; scan rate:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ .

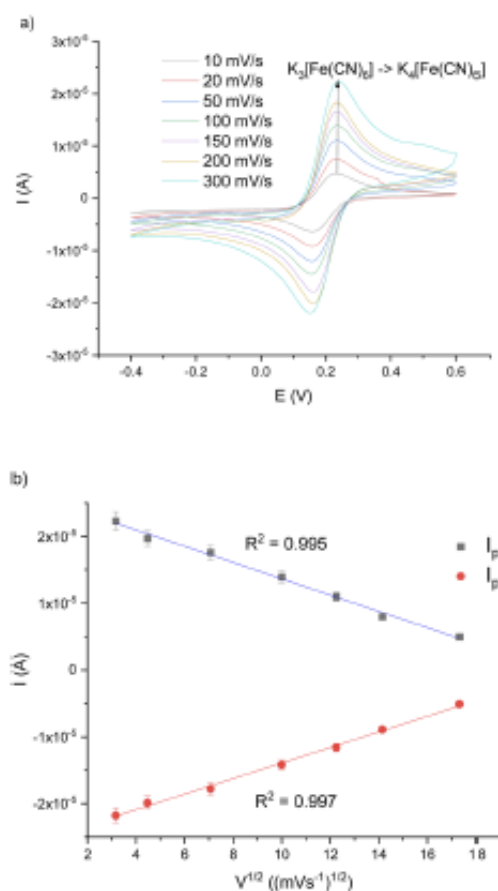


Fig. 6 (a) CV-voltammogram showing AuE/SAM/AuNPs/EDC/NHS/Ab/BSA in 5 mM ferri/ferrocyanide redox probe and 0.1 M  $KNO_3$  at different scanning rates (10–300  $mV s^{-1}$ ); potential range: –0.4–0.6 V; vs. Ag/AgCl; (b) linear relationship between scan rate and current ( $I_{pc}$  – red line;  $I_{pa}$  – blue line).

Results described above corroborate that all molecules were successfully used to modify the AuE surface, and the immunosensor could be applied for the VP1 determination.

Furthermore, the scan rate and the correlation between the current of anodic/cathodic peak were also investigated at every step during the immunosensor fabrication. CV has been performed in the same potential range at different scan rates (10–300  $mV s^{-1}$ ). As can be observed in Fig. 6a, current signals obtained from both cathodic and anodic peaks ( $I_{pc}$ ,  $I_{pa}$ , respectively) increase along with the scan rates. In combination with the results obtained from the relationship of  $I_{pc}$  and  $dI_{pa}$  values vs. square root of scan rates ( $v^{1/2}$ ), presented in Fig. 6b, which shows good linearity ( $R^2 = 0.995$  for  $I_{pa}$  and  $R^2 = 0.997$  for  $I_{pc}$ ), it may suggest that the electrochemical process of the interface for the immunosensor was a diffusion-

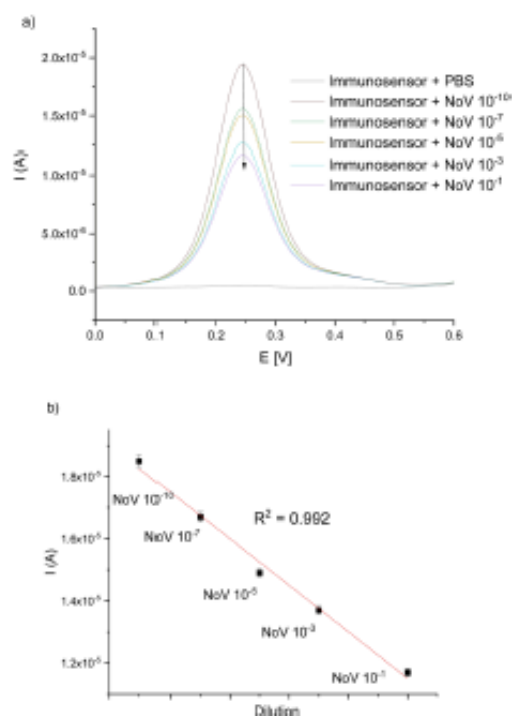


Fig. 7 (a) Representative DPV-scans for different NoV dilutions in the potential range of 0–0.6 V vs. Ag/AgCl; (b) linear relationship between the current and NoV dilution.

controlled process.<sup>23</sup> Because of that, results obtained in the next step are only from the tested VP1 protein of NoV.

### 3.2. Analytical performance of the immunosensor

For the characterization of the working parameters of the immunosensor, the DPV technique was used.

As can be seen in Fig. 7a, obtained DPV peaks were inversely proportional to the exposed concentrations of NoV, due to the fact that binding of the VP1 protein of NoV to the antibody causes an increase in resistance and therefore a decrease in current values.<sup>20</sup> The corresponding calibration curve, shown in Fig. 7b, represents good linearity in the investigated range ( $1 \times 10^{-9}$ – $1 \times 10^{-13}$  TCID<sub>50</sub>) with  $R^2 = 0.992$ . The detection limit (LOD) was the lowest concentration of virus detected by presented method –  $1 \times 10^{-13}$  TCID<sub>50</sub>.

Regeneration of the immunosensor was done by soaking the platform in 200 mM KSCN solution<sup>24</sup> for 4 min and then washing it with doubly distilled water and PBS solution for 30 seconds.

Some examples of electrochemical immunosensors and biosensors for NoV detection can be found in recent literature. Hong *et al.* reported biosensor based on concanavalin-A (Con-A) immobilized onto a gold electrode to detect human NoV, applying an electrochemical transducer.<sup>25</sup> The developed

biosensor gave a response of NoV detection after approx. 1 h and presented good parameters of sensitivity and selectivity. Accuracy test provided in lettuce gave a very good response with a detection limit of 60 genomic copies per mL. Another electrochemical approach presented by Wang *et al* was based on the utilization of a modified aptamer in the biorecognition part for murine norovirus detection (as an alternative to human NoV).<sup>27</sup> Gold electrode was modified by a thiolated aptamer AG3 and specific binding to murine NoV. The researchers applied the cyclic voltammetry method to characterize the aptamer binding and square wave voltammetry (SWV) was employed to check the NoV capture. Such immunosensor gave a sensitive and fast response and was simple to prepare. Chand and Nee-thirajan described a microfluidic chip consisting of screen-printed carbon electrodes and polydimethylsiloxane for the electrochemical detection of human NoV.<sup>28</sup> Silica magnetic beads were used to fill the chip for concentrating the virus samples and also for the filtration of clinical samples. The biorecognition part was prepared as follows: carbon electrode was modified with gold nanoparticles and thiolated streptavidin, onto which the human NoV-specific aptamers labelled with ferrocene (as redox probes) and biotin were immobilized. Scientists conducted their research using differential pulse voltammetry and obtained the detection limit equal to 100 pM.

### 3.3. Tests in food and bacteria samples, reproducibility and stability studies

The selectivity, accuracy, and stability are one of the most important parameters characterizing biosensors. Described here immunosensor for the NoV detection should be suitable for medical diagnostic purposes. To test the accuracy of the constructed immunosensor, a few common food samples and bacteria species were infected with NoV an DPV was applied. Obtained current value of  $1 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub> NoV was compared to the current signal obtained from the infected, investigated samples. As can be observed in Fig. 8, all analyzed species showed an excellent recovery value, only very slight (<3%) changes are visible in the current response in detected food/bacteria samples infected by NoV in comparison with NoV. Presented results clearly show that the proposed

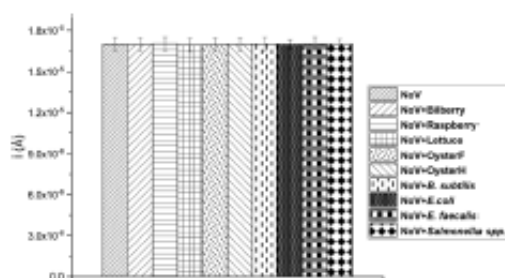


Fig. 8 Recovery test of the immunosensor for NoV.

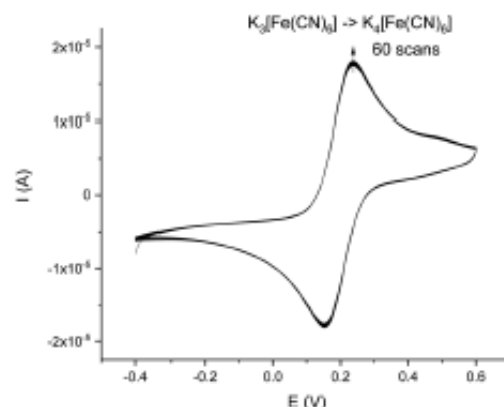


Fig. 9 Representative CV-scans of Au/SAM/AuNPs/EDC/NHS/Ab/BSA in the presence of 5 mM  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  in 0.1 M  $\text{KNO}_3$  after 2 weeks. Potential range:  $-0.4$ – $0.6$  V, scan rate  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , vs. Ag|AgCl electrode, 60 cycles.

immunosensor can be successfully used for the determination of NoV in diagnostics and food quality investigations.

The reproducibility of the Au/SAM/AuNPs/EDC/NHS/Ab/BSA immunosensor for the NoV determination was tested by the DPV method by checking the current of the same concentration of NoV ( $1 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub>) with four, modified in the same way, gold electrodes. The average current was calculated as 1554  $\mu\text{A}$ . The results exhibited a 5.12% relative standard deviation (RSD), showing very good reproducibility.

Good, long-term stability is one of the issues biosensors are facing. The stability was tested after storing the immunosensor at 4 °C (humid conditions) for 2 weeks after all experiments. The stability test was carried out using the CV method (Fig. 9). The average electrical current decreased in comparison with the original signal by approx. 4%, which shows that the constructed immunosensor is characterized by very high stability, possibly resulting from a very strong and well-prepared modified electrode for the Ab immobilization.

### 3.4. RT-PCR

Laboratory mice are most commonly infected with mouse norovirus and various effects of infection have been reported.<sup>29</sup> To confirm infection, tests based on RT-qPCR (real-time reverse transcription polymerase chain reaction) are often used, RT-LAMP (isothermal amplification *via* a reverse transcription loop).<sup>30,31</sup> Due to the lack of a robust tissue culture system for human norovirus, mouse norovirus are often used in many studies,<sup>32</sup> and still for the diagnosis of norovirus infection, the most common method is RT-qPCR, however, it is very time-consuming and requires specialized personnel and equipment, which is why other, simpler methods are researched.<sup>33</sup> In this study, RT-qPCR has been used as a reference method, as an additional confirmation for the electrochemical measurements of biosensor's accuracy.<sup>34</sup> As can be

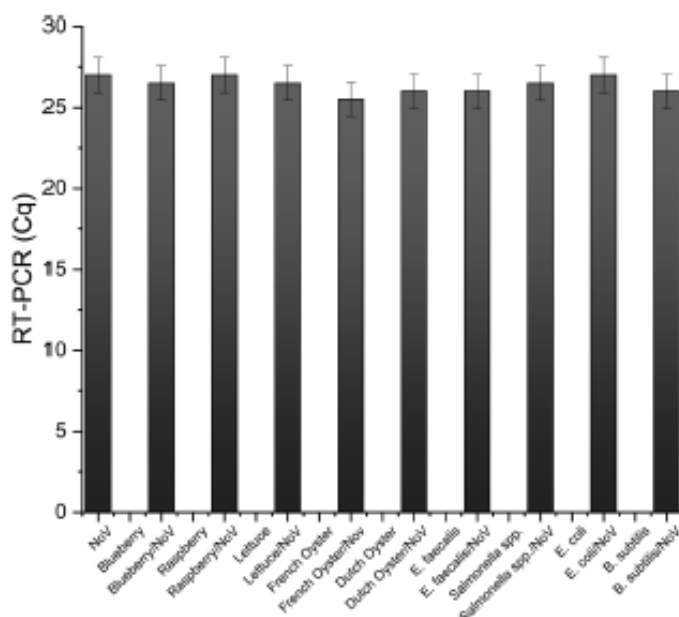


Fig. 10 Reader tested samples submitted for RT-PCR analysis.

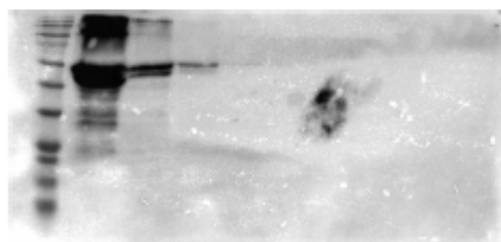


Fig. 11 Dilution series of norovirus detected by western blot technique (1st well contained molecular ladder 3-colour prestained protein marker (10–245 kDa) blrt, the rest of the wells contained mouse norovirus at a range of dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-9}$ ).

observed in the Fig. 10, obtained results from RT-qPCR are almost identical with selectivity tests obtained from described here electrochemical biosensor.

Western blot is used in research to separate and identify proteins. In scientific studies of human as well as mouse norovirus, the western blot technique is frequently used.

The created sensor detected the VP1 protein of mouse norovirus, and to confirm the presence of this protein in the sample, a number of dilutions were tested by western blot technique. In the experiment, 3 well visible bands and one faintly visible band were observed (Fig. 11). All striations are located at 70 kDa, which corresponds to the size of the VP1 protein.

## 4. Conclusions

In this paper, the electrochemical immunosensor using gold nanoparticles for NoV detection was constructed. AuNPs were utilized for the enhancement of obtained electrical signal and EDG/NHS allowed the creation of a well-oriented monolayer, which results in better antibody/antigen interaction. An antibody specific to the surface protein of the VP1 virus was the base of the measurement system. Binding of the VP1 protein to the antibody caused a decrease in the current, which was proportional to the concentration of NoV sample. The detection limit was  $1 \times 10^{-18}$  TCID<sub>50</sub>. Designed immunosensor exhibited good performance, selectivity, and sensitivity. To our knowledge, this study is the first report with application of SAM/EDC-NHS, and an antibody as a platform on a gold electrode surface for NoV detection. What is more, the described system showed excellent recovery values, good linearity, and long-term stability, which is essential for the construction of bio-devices for point-of-care testing or fast analytical devices. Future research should focus on a thorough understanding of the VP1 protein capture mechanism, which may result in the construction of a real chip for rapid diagnosis. It is also important to thoroughly optimize the system in the context of real biological samples (like feces).

## Data availability

There is an availability of sharing data and materials, after request.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest regarding the content presented in this article.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Wrocław University of Science and Technology and University of Environmental and Life Sciences in Wrocław.

## References

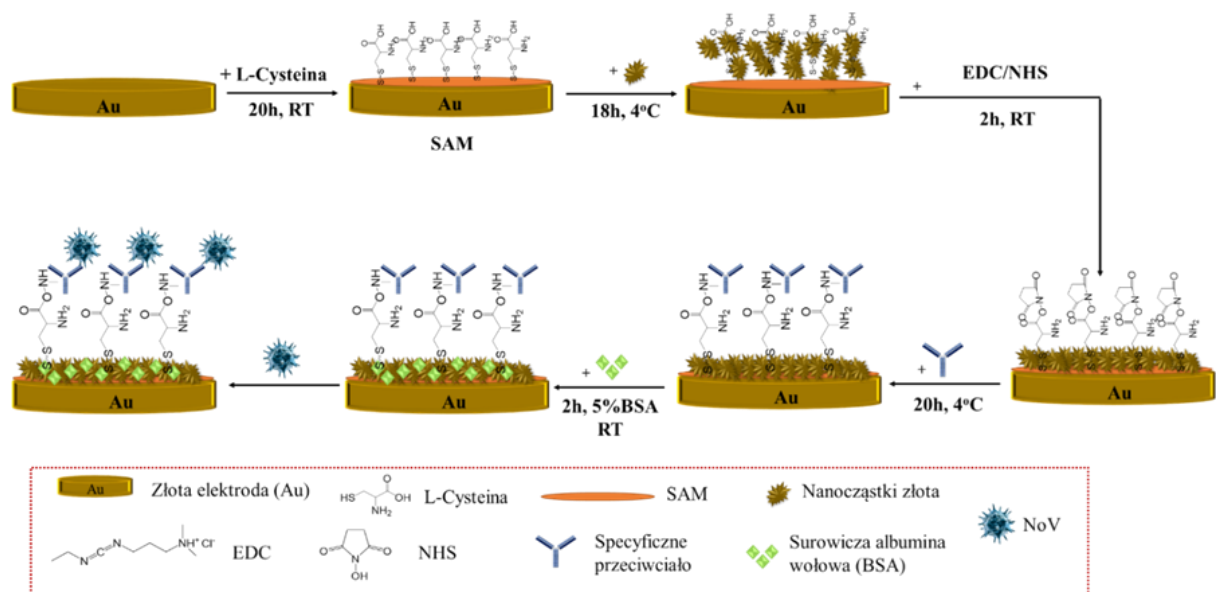
- 1 Z. Rahmati and M. Roushani, SARS-CoV-2 virus label-free electrochemical nanohybrid MIP-aptasensor based on Ni<sub>3</sub>(BTC)<sub>2</sub> MOF as a high-performance surface substrate, *Microchim. Acta*, 2022, **189**, 287, DOI: 10.1007/S00604-022-05357-8.
- 2 J. L. Cannon, J. Bonifacio, F. Bucardo, J. Buesa, L. Bruggink, M. Chi-Wai Chan, T. M. Fumian, S. Giri, M. D. Gonzalez, J. Hewitt, J. H. Lin, J. Mans, C. Muñoz, C. Y. Pan, X. L. Pang, C. Pietsch, M. Rahman, N. Sakon, R. Sevarangan, H. Browne, L. Barclay and J. Vinjé, Global Trends in Norovirus Genotype Distribution among Children with Acute Gastroenteritis, *Emerging Infect. Dis.*, 2021, **27**, 1438–1445, DOI: 10.3201/EID2705.204756.
- 3 S. M. Ahmed, A. J. Hall, A. E. Robinson, L. Verhoef, P. Premkumar, U. D. Parashar, M. Koopmans and B. A. Lopman, Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect. Dis.*, 2014, **14**, 725–730, DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.
- 4 E. Alfano-Sobsey, D. Sweat, A. Hall, F. Breedlove, R. Rodriguez, S. Greene, A. Pierce, M. Sobsey, M. Davies and S. L. Ledford, Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission, *Epidemiol. Infect.*, 2012, **140**, 276–282, DOI: 10.1017/S0950268811000665.
- 5 P. K. C. Cheng, D. K. K. Wong, T. W. H. Chung and W. W. L. Lim, Norovirus contamination found in oysters worldwide, *J. Med. Virol.*, 2005, **76**, 593–597, DOI: 10.1002/JMV.20402.
- 6 J. A. Lowther, N. E. Gustar, A. L. Powell, R. E. Hartnell and D. N. Lees, Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 5812–5817, DOI: 10.1128/AEM.01046-12.
- 7 H. Y. Kim, I. S. Kwak, I. G. Hwang and G. P. Ko, Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit, *J. Virol. Methods*, 2008, **153**, 104–110, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2008.07.022.
- 8 L. Baert, M. Uyttendaele and J. Debevere, Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GI detection, *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, **123**, 101–108, DOI: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.12.020.
- 9 P. Tian, D. Yang and R. Mandrell, Differences in the binding of human norovirus to and from romaine lettuce and raspberries by water and electrolyzed waters, *J. Food Prot.*, 2011, **74**, 1364–1369, DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-494.
- 10 M. Roushani, Z. Rahmati, M. Golchin, Z. Lotfi and M. Nemat, Electrochemical immunosensor for determination of Staphylococcus aureus bacteria by IgY immobilized on glassy carbon electrode with electrodeposited gold nanoparticles, *Microchim. Acta*, 2020, **187**, 567, DOI: 10.1007/S00604-020-04547-6.
- 11 W. Wen, X. Yan, C. Zhu, D. Du and Y. Lin, Recent Advances in Electrochemical Immunosensors, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 139–156, DOI: 10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04281.
- 12 I. H. Cho, J. Lee, J. Kim, M. S. Kang, J. K. Paik, S. Ku, H. M. Cho, J. Inudayaraj and D. H. Kim, Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification, *Sensors*, 2018, **18**, 207, DOI: 10.3390/S18010207.
- 13 S. M. Deyev and E. N. Lebedenko, Modern Technologies for Creating Synthetic Antibodies for Clinical application, *Acta Nat.*, 2009, **1**, 32–50, DOI: 10.32607/20758251-2009-1-1-32-50.
- 14 Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu and C. Fan, Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **47**, 1–11, DOI: 10.1016/J.BIOS.2013.02.045.
- 15 D. Knopp, D. Tang and R. Niessner, Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **647**, 14–30, DOI: 10.1016/J.ACA.2009.05.037.
- 16 N. J. Alves, N. Mustafaoglu and B. Bilgicer, Conjugation of a reactive thiol at the nucleotide binding site for site-specific antibody functionalization, *Bioconjugate Chem.*, 2014, **25**, 1198–1202, DOI: 10.1021/BC500211D.
- 17 F. Mollarasouli, S. Kurbanoglu and S. A. Ozkan, The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis, *Biosensors*, 2019, **9**, 86, DOI: 10.3390/BIOS9030086.
- 18 A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 1533–1554, DOI: 10.1021/CR9502357.
- 19 A. Kumar, H. A. Biebuyck and G. M. Whitesides, Patterning Self-Assembled Monolayers: Applications in Materials Science, *Langmuir*, 1994, **10**, 1498–1511, DOI: 10.1021/LA00017A030.
- 20 R. Subbiah, M. Veerapandian and K. S. Yun, Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences, *Curr. Med. Chem.*, 2011, **17**, 4559–4577, DOI: 10.2174/092986710794183024.
- 21 A. Valipour and M. Roushani, Using silver nanoparticle and thiol graphene quantum dots nanocomposite as a substratum to load antibody for detection of hepatitis C virus core antigen: Electrochemical oxidation of riboflavin was used as redox probe, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **89**, 946–951, DOI: 10.1016/J.BIOS.2016.09.086.
- 22 K. K. Jain, Current status of molecular biosensors, *Med. Device Technol.*, 2003, **14**, 10–15. <https://europepmc.org/article/med/12774570>.

- 23 J. Wang, R. Polsky and D. Xu, Silver-Enhanced Colloidal Gold Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization, *Langmuir*, 2001, **17**, 5739–5741, DOI: 10.1021/LA011002F.
- 24 J. Wang, D. Xu and R. Polsky, Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4208–4209, DOI: 10.1021/JA0255709.
- 25 Y. Li, H. J. Schluessener and S. Xu, Gold nanoparticle-based biosensors, *Gold Bull.*, 2010, **43**, 29–41, DOI: 10.1007/BF03214964.
- 26 M. Kitajima, T. Oka, H. Takagi, Y. Tohya, H. Katayama, N. Takeda and K. Katayama, Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses, *J. Virol. Methods*, 2010, **169**, 269–273, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2010.07.018.
- 27 F. Ricci, G. Adornetto and G. Palleschi, A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors, *Electrochim. Acta*, 2012, **84**, 74–83, DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2012.06.033.
- 28 A. M. Faria, E. B. M. I. Peixoto, C. B. Adamo, A. Flacker, E. Longo and T. Mazon, Controlling parameters and characteristics of electrochemical biosensors for enhanced detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 7411, DOI: 10.1038/s41598-019-43680-y.
- 29 H. Zhao, W. Xie, R. L. Zhang, X. D. Wang, H. F. Liu, J. Li, T. Sha, X. S. Guo, Q. M. Sun, Y. P. Zhang and C. P. Li, Electrochemical sensor for human norovirus based on covalent organic framework/pillararene heterosupramolecular nanocomposites, *Talanta*, 2022, **237**, 122896, DOI: 10.1016/J.TALANTA.2021.122896.
- 30 N. Wang, G. Pan, S. Guan, S. Rong, D. Wang, Z. Gao, P. Tian and Q. Li, A Broad-Range Disposable Electrochemical Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Electrodes for Detection of Human Noroviruses, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, **10**, 845660, DOI: 10.3389/FBIOE.2022.845660.
- 31 S. A. Hong, J. Kwon, D. Kim and S. Yang, A rapid, sensitive and selective electrochemical biosensor with concanavalin A for the preemptive detection of norovirus, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **64**, 338–344, DOI: 10.1016/J.BIOS.2014.09.025.
- 32 J. M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño and A. González-Cortés, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta*, 2008, **53**, 5848–5866, DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2008.03.005.
- 33 K. S. Ma, H. Zhou, J. Zoval and M. Madou, DNA hybridization detection by label free versus impedance amplifying label with impedance spectroscopy, *Sens. Actuators, B*, 2006, **114**, 58–64, DOI: 10.1016/J.SNB.2005.04.038.
- 34 A. A. Ensafi, M. Taei, H. R. Rahmani and T. Khayamian, Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 8176–8183, DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2011.05.124.
- 35 I. G. Munteanu and C. Apetrei, Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 3380, DOI: 10.3390/IJMS22073380.
- 36 R. Radhakrishnan and I. I. Suni, Antibody regeneration on degenerate Si electrodes for calibration and reuse of impedance biosensors, *Sens. Bio-Sens. Res.*, 2016, **7**, 20–24, DOI: 10.1016/J.SBSR.2015.11.008.
- 37 N. Wang, M. Kitajima, K. Mani, E. Kanhere, A. J. Whittle, M. S. Triantafyllou and J. Miao, Miniaturized electrochemical sensor modified with aptamers for rapid norovirus detection, 2016 IEEE 11th Annual International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS), 2016, pp. 587–590, DOI: 10.1109/NEMS.2016.7758320.
- 38 R. Chand and S. Neethinjan, Microfluidic platform integrated with graphene-gold nano-composite aptasensor for one-step detection of norovirus, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **98**, 47–53, DOI: 10.1016/J.BIOS.2017.06.026.
- 39 K. R. Pritchett-Coming, J. Cosentino and C. B. Clifford, Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats, *Lab. Anim.*, 2009, **43**, 165–173, DOI: 10.1258/LA.2008.008009.
- 40 M. Tajima, Y. Kotani, T. Kurosawa and M. Miyasaka, A Pitfall in Mouse Norovirus (MNV) Detection in Fecal Samples Using RT-PCR, and Construction of New MNV-Specific Primers, *Exp. Anim.*, 2013, **62**, 127–135, DOI: 10.1538/EXPANIM.62.127.
- 41 K. I. Hanaki, F. Ike, A. Kajita, W. Yasuno, M. Yanagiba, M. Goto, K. Sakai, Y. Ami and S. Kyuwa, Detection of murine norovirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, *J. Virol. Methods*, 2014, **204**, 17–24, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2014.03.025.
- 42 M. Kitajima, T. Oka, Y. Tohya, H. Katayama, N. Takeda and K. Katayama, Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan, *Microbiol. Immunol.*, 2009, **53**, 531–534, DOI: 10.1111/J.1348-0421.2009.00152.X.
- 43 M. Roushani, M. Sarabaegi and F. Pourahmad, Impedimetric aptasensor for *Pseudomonas aeruginosa* by using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles, *Microchim. Acta*, 2019, **186**, 725, DOI: 10.1007/S00604-019-3858-V/.

## 14. SUPLEMENT

### 14.1. Opis inkubacji testu szybkiego wykrywania norowirusów

Warstwa receptorowa została zaprojektowana w następujący sposób: początkowo złotą elektrodę (AuE) oczyszczano z kurzu i innych zanieczyszczeń, poprzez mechaniczne polerowanie przy pomocy proszku diamentowego (cząstki o średnicy 3  $\mu\text{m}$ ), następnie wypłukiwano w etanolu i przemywano w wodzie dejonizowanej. Elektrodę pozostawiano na powietrzu, w temperaturze pokojowej do wyschnięcia. Powierzchnię elektrody przed modyfikacją aktywowano 0,5 M kwasem siarkowym stosując technikę woltamperometrii cyklicznej (zakres potencjałów 0-1,4 V) przez 60 cykli. Następnie przystępowano do konstrukcji warstwy detekcyjnej. Zaktywowaną powierzchnię złotej elektrody w pierwszym etapie zanurzano w 0,05 M l-cysteinie i inkubowano przez 20 h, aby spontanicznie utworzyć samoorganizującą się monowarstwę (SAM), tworząc film bogaty w grupy tiolowe. Następnie do elektrody AuE/SAM dodawano nanocząsteczki złota i pozostawiano do inkubacji w temperaturze 4 °C przez 18 h. W kolejnym kroku, na powierzchnię nakładano 20  $\mu\text{l}$  chlorowodoru 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu - EDC/NHS na dwie godziny, w temperaturze pokojowej. Poprzez zastosowanie EDC/NHS tworzyła się dobrze zorientowana monowarstwa, poprawiająca kontakt między przeciwciałem a antygenem [1]. Przeciwciało rozcieńczano w stosunku 1:5000, zgodnie z literaturą [2] a 20  $\mu\text{l}$  nakładano na elektrodę AuE/SAM/AuNPs/EDC/NHS na 20 h, w temperaturze 4 °C. Był to przedostatni etap procesu. W ostatnim etapie na powierzchnię elektrody nakładano 0,5% albuminy surowicy bydlęcej (BSA), inkubowano przez 2 h w temperaturze pokojowej, w celu zablokowania miejsc niezwiązanych z powierzchnią zmodyfikowanej elektrody. Kolejne etapy modyfikacji przedstawiono schematycznie na Ryc. S1.



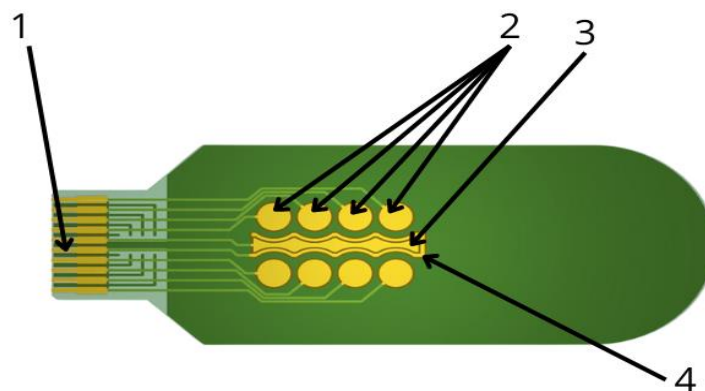
**Rycina S1.** Schemat modyfikacji elektrody. SAM - samoorganizująca się monowarstwa ; EDC- chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu. Legenda: NHS -ester -N-hydroksysukcynoimidowy, BSA - surowica bydlęca.

## 14.2. Prototyp testu szybkiego wykrywania norowirusów

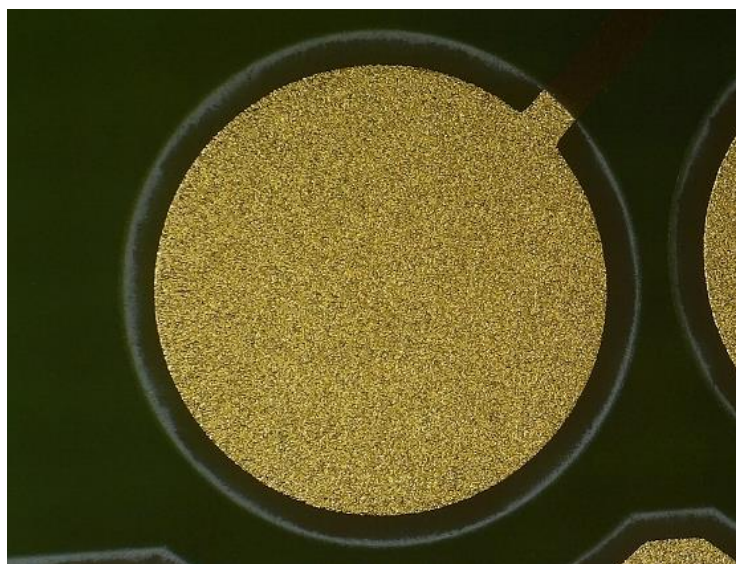
### 14.2.1 Jednorazowy czujnik – test

Czujnik służy do pomiarów impedancji próbki w układzie potencjostatu, który zawiera elektrodę odniesienia (RE), charakteryzującą się stałym potencjałem, stanowiącym punkt odniesienia podczas bezprądowych pomiarów innych elektrod. Elektroda pomocnicza (CE) charakteryzuje się niereaktywnością, posiada dużą powierzchnię i uzupełnia obwód. Elektrody posiadają wyprowadzone kontakty elektryczne na krawędzi czujnika w formie złącza krawędziowego. Układ ten zawiera 8 elektrod roboczych (WEn), które bezpośrednio uczestniczą w reakcjach elektrochemicznych zachodzących w badanym roztworze. Elektroda odniesienia RE jest wspólna dla wszystkich elektrod roboczych WEn, a jej fragment znajdujący się obok elektrody roboczej WEn tworzy segment pomiarowy RE-CEWEn. Wyróżnia się osiem WEn, na które w procesie produkcji nanoszona jest warstwa bioczuła. Pole przeciwelektrod jest wspólne dla nich wszystkich. W celu uśrednienia wyników, zastosowano osiem pól elektrod roboczych, co odpowiada ośmiu otrzymanym widmom impedancji w jednym cyklu pomiaru.





**Rycina S2.** Jednorazowy test – elektroda. 1: wyprowadzające kontakty elektryczne, 2: elektrody robocze, 3: elektroda zliczająca, 4: elektroda odniesienia.



**Rycina S3.** Zdjęcie z mikroskopu optycznego przedstawiające segment pomiarowy (powiększenie 40x).

#### 14.2.2. Urządzenie pomiarowe Aquanostic Reader

Pomiary zostały wykonane przy użyciu urządzenia Aquanostic Reader oraz autorskiej aplikacji zbierającej wyniki, będącej własnością intelektualną firmy Food4Future Technologies. Urządzenie zostało opracowane w projektach unijnych „FishSensor – prace badawczo-rozwojowe nad opracowaniem systemu wykrywającego patogeny w hodowlach ryb” (POIR.01.01.01-00-0225/17-00) oraz „Shrimp Health Alert – szybki i precyzyjny test Point of Care do detekcji patogenów na farmach krewetek” (POIR.01.01.01-00-0758/19-00). Aquanostic Reader to kompaktowy analizator elektrochemiczny zaprojektowany do obsługi przez osoby nieposiadające wykształcenia elektrochemicznego. Frontend urządzenia został tak zaprojektowany, aby wykorzystywać przetworniki analogowe

zintegrowane z mikrokontrolerem. Matryca odpowiada za podłączenie biosensorów do sygnałów elektrycznych. Urządzenie działa w szerokim zakresie parametrów, obejmując moduł impedancji od 1 k $\Omega$  do 1 M $\Omega$ , rezystancję od 680  $\Omega$  do 10 M $\Omega$ , potencjał obwodu otwartego od -200 mV do +200 mV oraz częstotliwość pomiaru częstotliwości od 1 Hz do 1 kHz.



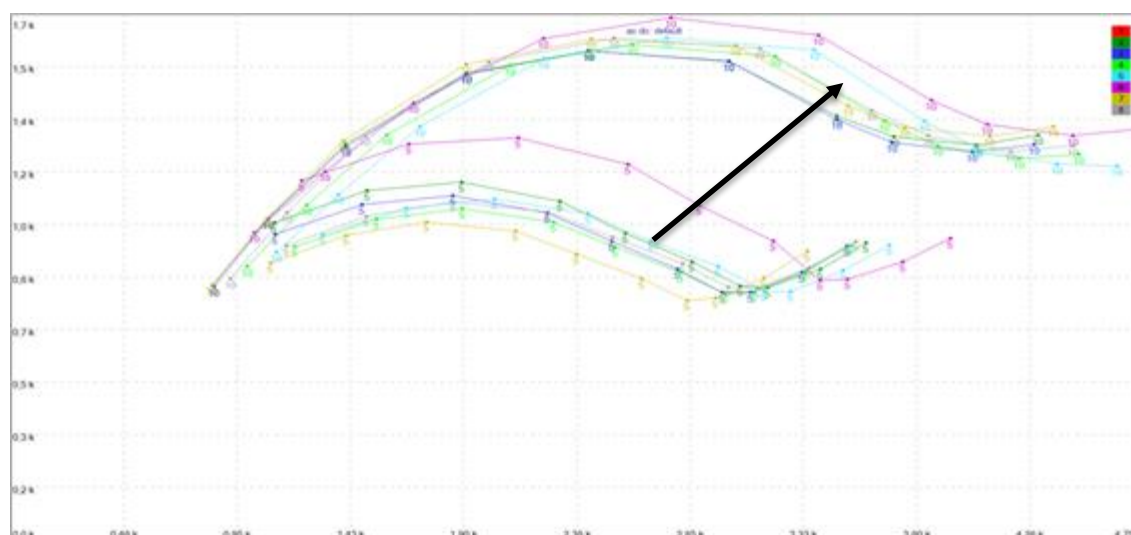
**Rycina S4.** Urządzenie pomiarowe Aquanostic Reader.

### **14.2.3. Zasady działania testu**

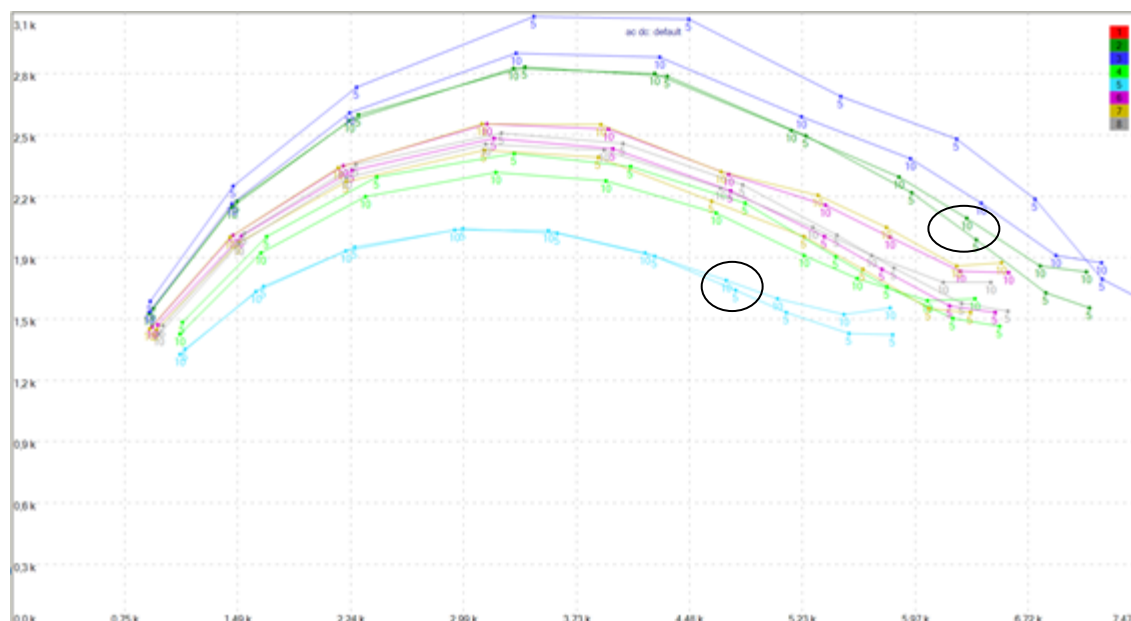
Proces pomiaru rozpoczyna się od syntezy sygnału pobudzającego o określonych parametrach czułości, amplitudzie i składowej stałej, który jest realizowany przez mikrokontroler przy użyciu przetwornika cyfrowo-analogowego (DAC). Sygnał wyjściowy trafia następnie do sekcji formatowania sygnału wejściowego, gdzie poddawany jest kompresji w celu minimalizacji zniekształceń związanych z procesem syntezy. Skompresowany sygnał, poprzez wtórnik napięciowy pełniący rolę bufora, trafia do elektrody CE czujnika. Odpowiedź prądowa czujnika na wybranej WE jest mierzona przez wzmacniacz transimpedancyjny, a przebieg prądu i napięcia jest rejestrowany przez przetworniki analogowo-cyfrowe (ADC). Cyfrowe dane pozyskane z przetworników DAC są następnie przetwarzane przez algorytm cyfrowego przetwarzania sygnałów (DSP), aby

obliczyć impedancję zespoloną dla bieżącego punktu pomiarowego. Proces ten jest powtarzany dla każdej zdefiniowanej częstotliwości i dla każdego kanału, tworząc tzw. cykl pomiarowy. Na pomiar czujnika składa się 560 indywidualnych pomiarów. Test wykorzystuje EIS, będącą metodą liniowego pomiaru elektrycznej odpowiedzi badanego materiału na pobudzenie elektromagnetycznym sygnałem w szerokim paśmie częstotliwości. Metoda ta opiera się na detekcji zmian w impedancji elektrycznej, która może być zarejestrowana za pomocą EIS. Impedancja ta może być zinterpretowana i wykorzystana do określenia obecności bakterii i wirusów.

Po nałożeniu na test próbki pozytywnej, widzimy zmianę impedancji – wzrost, który wynika z połączenia przeciwciała z norowirusem. Obserwowana reakcja jest wynikiem zmiany oporu dla prądu (Ryc. S5). W przypadku naniesienia próbki negatywnej obserwujemy niewielką zmianę lub jej brak (Ryc. S6). Zmiana ta wynika z porowatości i niedoskonałego pokrycia złotem w procesie galwanizacji elektrod pracujących.



**Rycina S5.** Widmo impedancyjne Nyquista, z nałożoną próbką zawierającą norowirusa. Na rycinie widoczna jest różnica (wzrost), między piątym a dziesiątym cyklem pomiarowym dla każdej elektrody pracującej.



**Rycina S6.** Widmo impedancyjne Nyquista z nałożonym materiałem badawczym negatywnym. Na rycinie obserwujemy spadek impedancji cyklu piątego względem dziesiątego z trzeciej elektrody pracującej (granatowej), oraz brak zmiany na pozostałych.

#### 14.2.4. Proces inkubacji prototypu testu szybkiego wykrywania norowirusów.

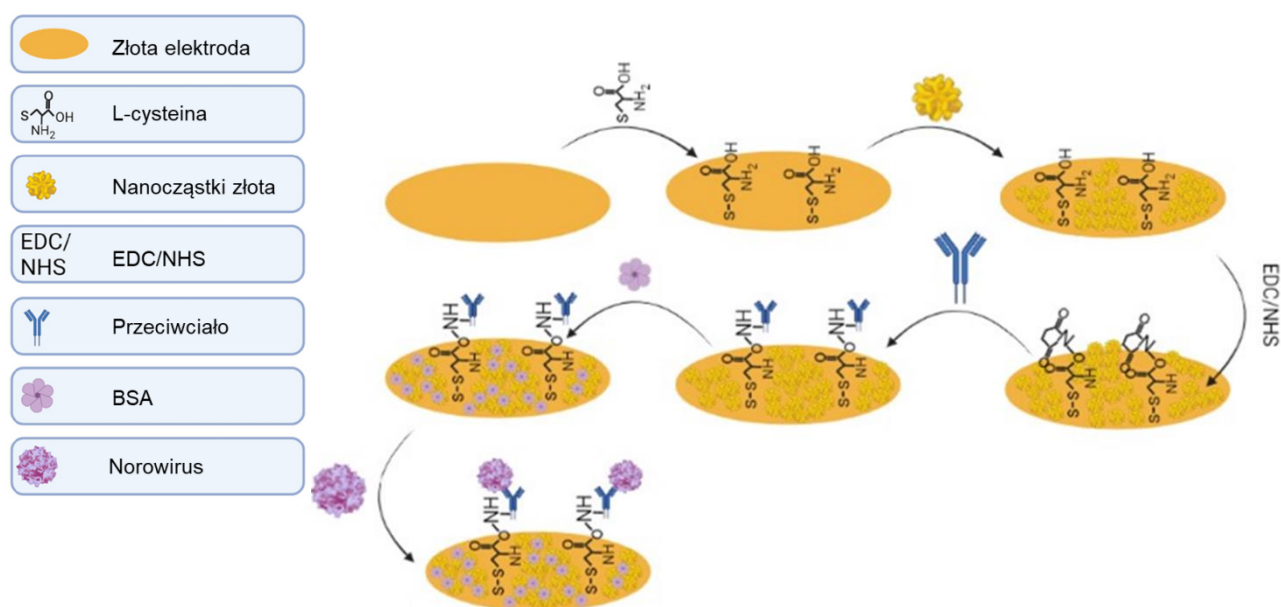
Proces inkubacji prototypu testu szybkiego wykrywania norowirusów ten przebiegał w sposób następujący:

1. Elektrody przemyto wodą DI, następnie etanolem 75% i ponownie wodą DI. Tak przygotowane podłoże osuszono oczyszczonym sprężonym powietrzem. Elektrode aktywowano przy użyciu 0,5 M kwasu siarkowego przez 60 cykli metodą woltamperometrii cyklicznej (zakres potencjałów 0 - 1,4 V, aż do uzyskania stabilnego woltamperogramu);
2. Nałożono L-cysteinę w stężeniu 50 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone), a następnie inkubowano przez 24 h w temperaturze pokojowej przy 100% wilgotności. Elektrody zostały następnie spłukane roztworem PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) i osuszone za pomocą oczyszczonego sprężonego powietrza;
3. Nałożono nanocząstki złota o średnicy 5 nm (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) i inkubowano przez 18 h w 4 °C przy 100% wilgotności. Ponownie spłukano elektrodę roztworem PBS i osuszono ją oczyszczonym sprężonym powietrzem;
4. Nałożono mieszaninę EDC/NHS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) i inkubowano przez 2 h w temperaturze pokojowej przy 100%

wilgotności. Elektrode ponownie spłukano roztworem PBS i osuszono oczyszczonym sprężonym powietrzem;

5. Nałożono przeciwciała, Anti-Norovirus (MNV-1) Antibody, clone 5C4.10 9 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) w stężeniu 0.10 mg/mL i inkubowano przez 22 h w 4 °C przy 100% wilgotności. Następnie elektrodę spłukano roztworem PBS i osuszono oczyszczonym sprężonym powietrzem;
6. Nałożono surowicę bydlęcą (BSA) w stężeniu 3% i inkubowano przez 2 h w temperaturze pokojowej przy 100% wilgotności. Elektrode ponownie spłukano roztworem PBS i osuszono oczyszczonym sprężonym powietrzem.

Szczegółowy proces nakładania materiałów zamieszczono na Rycinie S7.



**Rycina S7.** Procedura inkubacji i testu szybkiego wykrywania norowirusów. Na złotą elektrodę nałożono L-cysteinę, która wytworzyła samoorganizującą się monowarstwą. Dodano nanocząstki złota oraz EDC-chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu, NHS -ester -N-hydroksysukcynoimidowy, przeciwciała oraz BSA - surowica bydlęca. Na tak przygotowany test nakładano próbki zawierające norowirusa, który łączył się z przeciwciałem.

W Tabeli SI zaprezentowano wyniki próbek na których odbywała się walidacja.

Tabela SI. Wyniki RT-qPCR materiału badawczego.

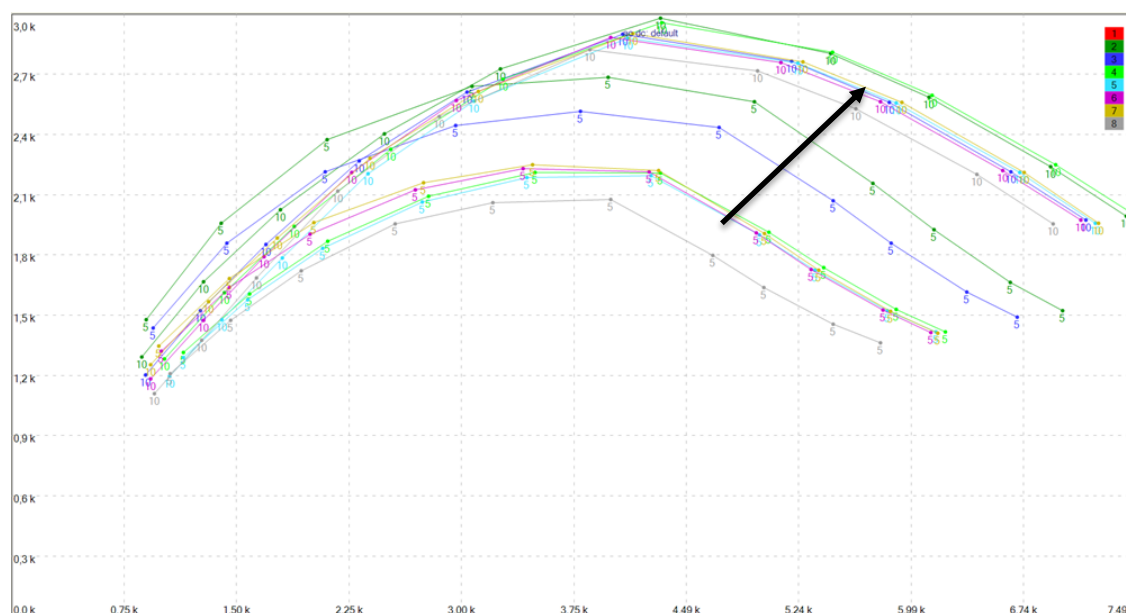
Numer próbki	Zawartość próbki	Wynik RT-qPCR [Cq]		
		MNV	HuNoV GI	HuNoV GII
1	MNV	23	0	0
2	MNV	22	0	0
3	MNV	19	0	0
4	MNV	20	0	0
5	MNV	18	0	0
4	płyn znad hodowli linii komórkowej RAW 264.7	0	0	0
5	płyn znad hodowli linii komórkowej RAW 264.7	0	0	0
6	płyn znad hodowli linii komórkowej RAW 264.7	0	0	0
7	płyn znad hodowli linii komórkowej RAW 264.7	0	0	0
8	płyn znad hodowli linii komórkowej RAW 264.7	0	0	0
9	HuNoV	0	0	13
10	HuNoV	0	0	15
11	HuNoV	0	0	23
12	HuNoV	0	0	27
13	HuNoV	0	0	28
14	płyn, w którym był zawieszony HuNoV	0	0	0
15	płyn, w którym był zawieszony HuNoV	0	0	0
16	płyn, w którym był zawieszony HuNoV	0	0	0
17	płyn, w którym był zawieszony HuNoV	0	0	0
18	płyn, w którym był zawieszony HuNoV	0	0	0
19	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0
20	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0
21	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0

22	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
23	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
24	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
25	<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0
26	<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0
27	<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0
28	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	0
29	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	0
30	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	0
31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
34	sałata lodowa	0	0	0
35	sałata lodowa	0	0	0
36	sałata lodowa	0	0	0
37	borówka amerykańska	0	0	0
38	borówka amerykańska	0	0	0
39	borówka amerykańska	0	0	0
40	malina właściwa	0	0	0
41	malina właściwa	0	0	0
42	malina właściwa	0	0	0
43	krewetka tygrysia	0	0	0
44	krewetka tygrysia	0	0	0
45	krewetka tygrysia	0	0	0
46	ostryga pacyficzna	0	0	0
47	ostryga pacyficzna	0	0	0
48	ostryga pacyficzna	0	0	0

#### 14.2.5. Walidacja testu szybkiego wykrywania norowirusów

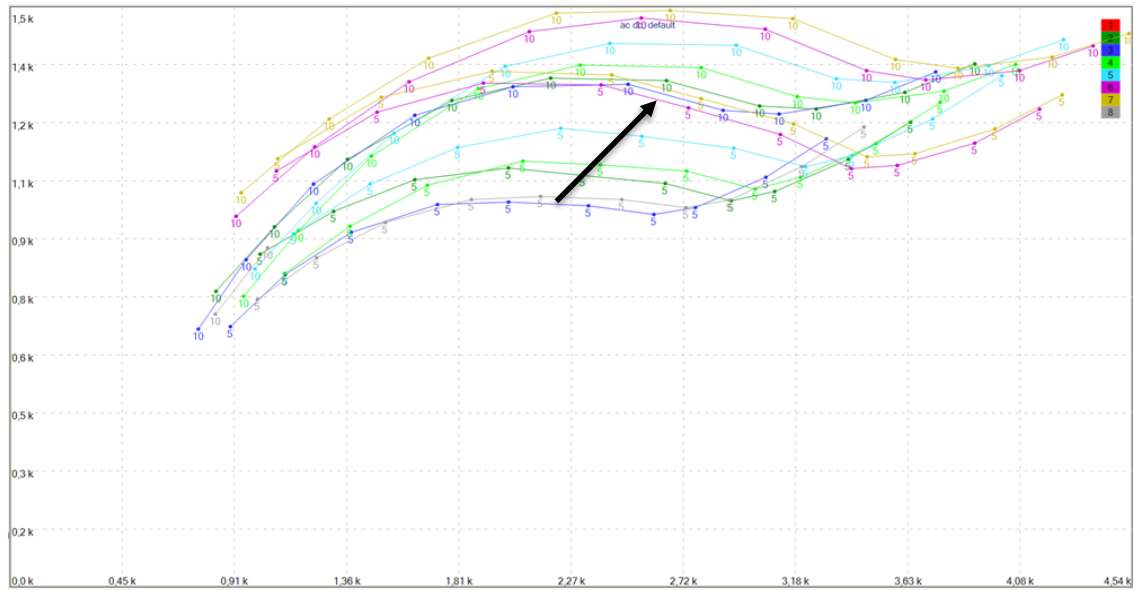
Na rycinach S8-S61 przedstawiono widmo impedancyjne Nyquista (wyniki z aplikacji wizualizującej pomiar „kjulog” stworzoną przez firmę Food4Future Technologies) ilustrujące zmiany impedancji w czasie pomiaru. Oś X reprezentuje rzeczywistą część impedancji, czyli  $Re(Z)$ , a oś Y reprezentuje ujemną część części urojonej impedancji,

czyli  $-\text{Im}(Z)$ . Wartości na osi wyrażono w kiloohmach. Wykres obejmuje 7 elektrod pracujących, z których każde zostało oznaczone kolorem: pole 1 (kontrola) - nieuwzględnione na wykresie, pole 2 - ciemna zieleń, pole 3 - granat, pole 4 - jaskrawy zielony, pole 5 - błękitny, pole 6 - różowy, pole 7 - żółty, pole 8 - szary. Każde pole zostało poddane pomiarowi przez 10 cykli (każdy cykl dla danej elektrody pracujące zostały oznaczone takim samym kolorem, z uwzględnianiem numeru cyklu). W 6 cyklu pomiarowym do każdego pola dodano badaną próbkę. W celu lepszej czytelności reakcji, na wykresach uwzględniono tylko cykle 5 i 10. Gdzie widoczna jest różnica w kontroli pozytywnej. Na części rycin widoczne są spadki impedancji, które przypuszczalnie mogły być spowodowane, nie pełnym pokryciem złotem w procesie galwanicznym elektrod pracujących.

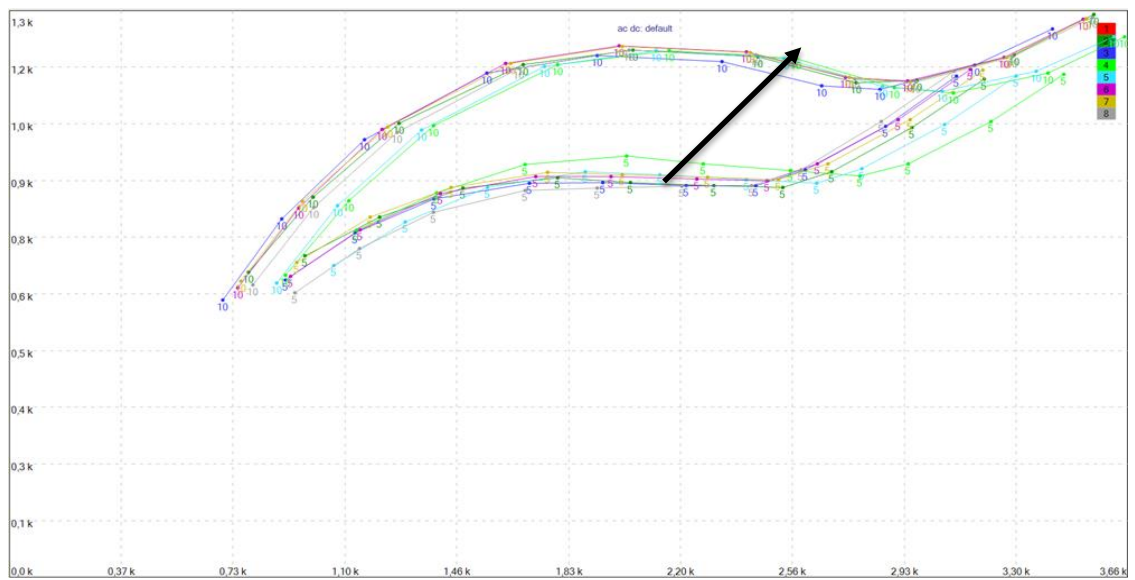


**Rycina S8.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką MNV.

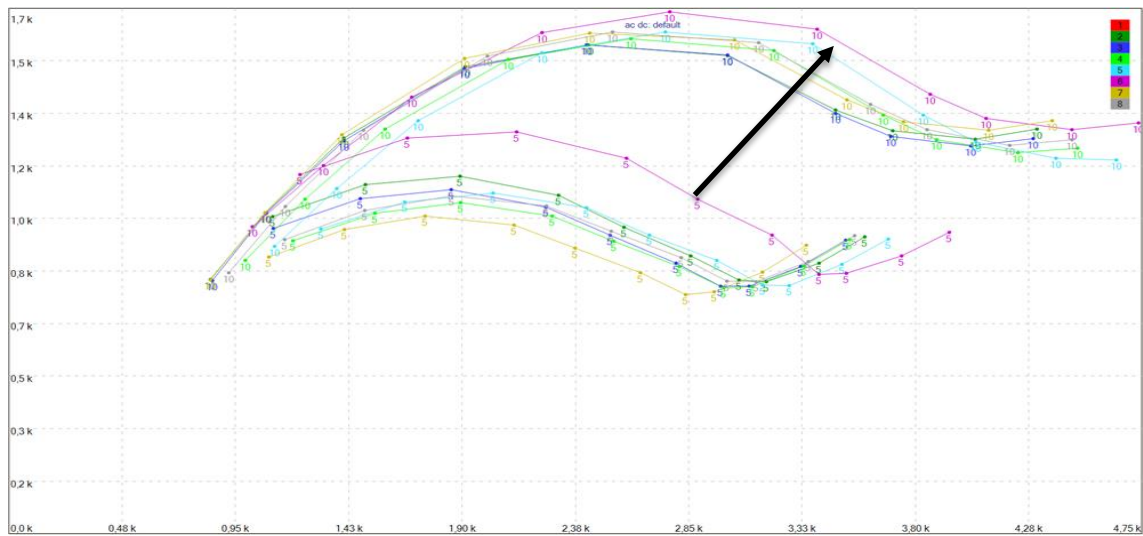




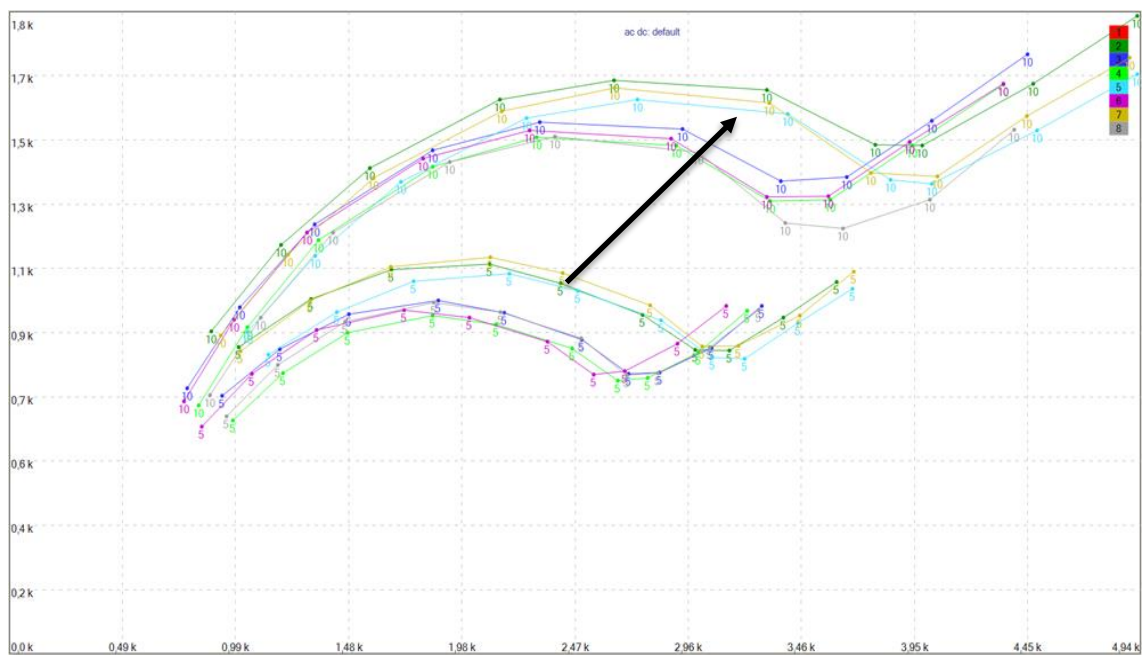
**Rycina S9.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką HuNoV.



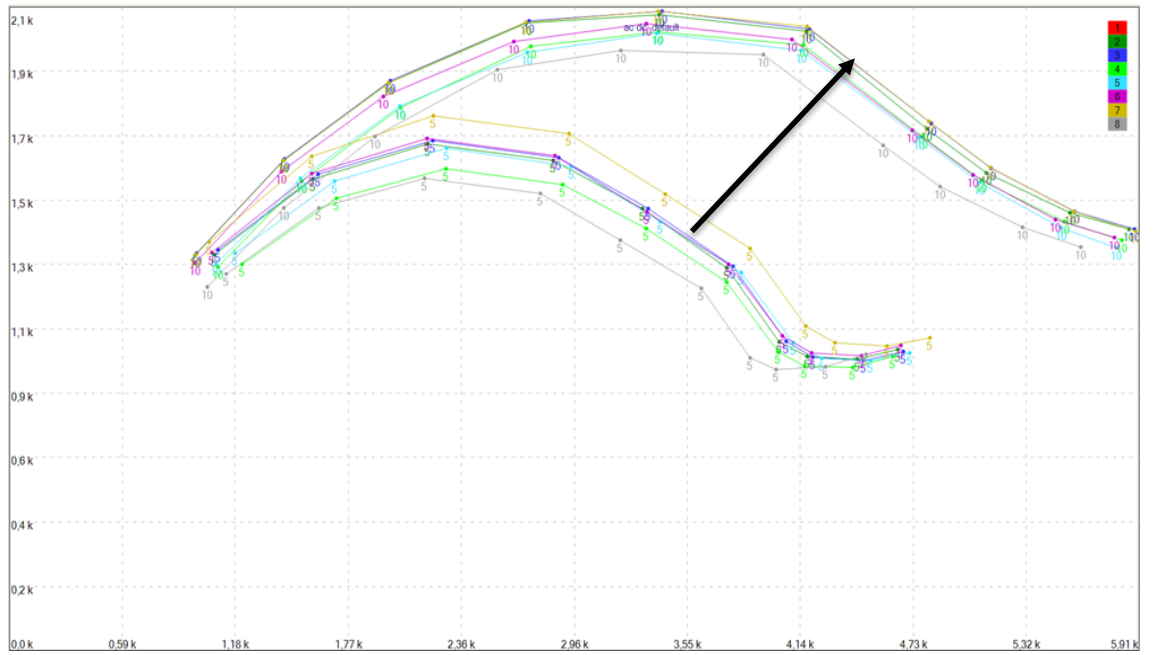
**Rycina S10.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką sałaty lodowej zmieszanej z MNV.



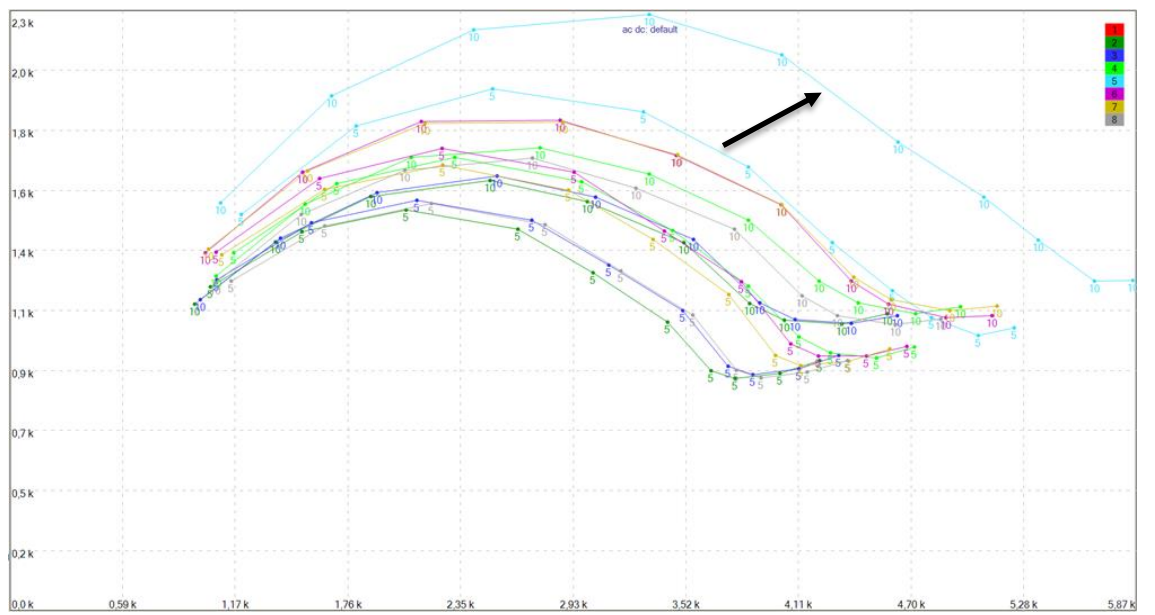
**Rycina S11.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką borówki amerykańskiej zmieszanej z MNV.



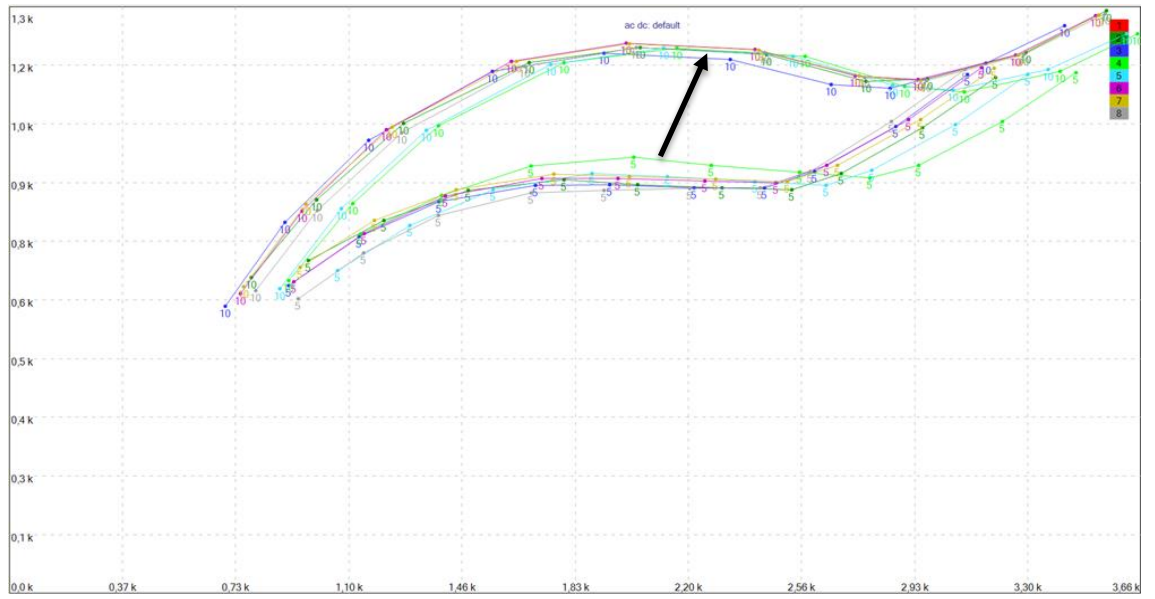
**Rycina S12.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką maliny właściwej zmieszanej z MNV.



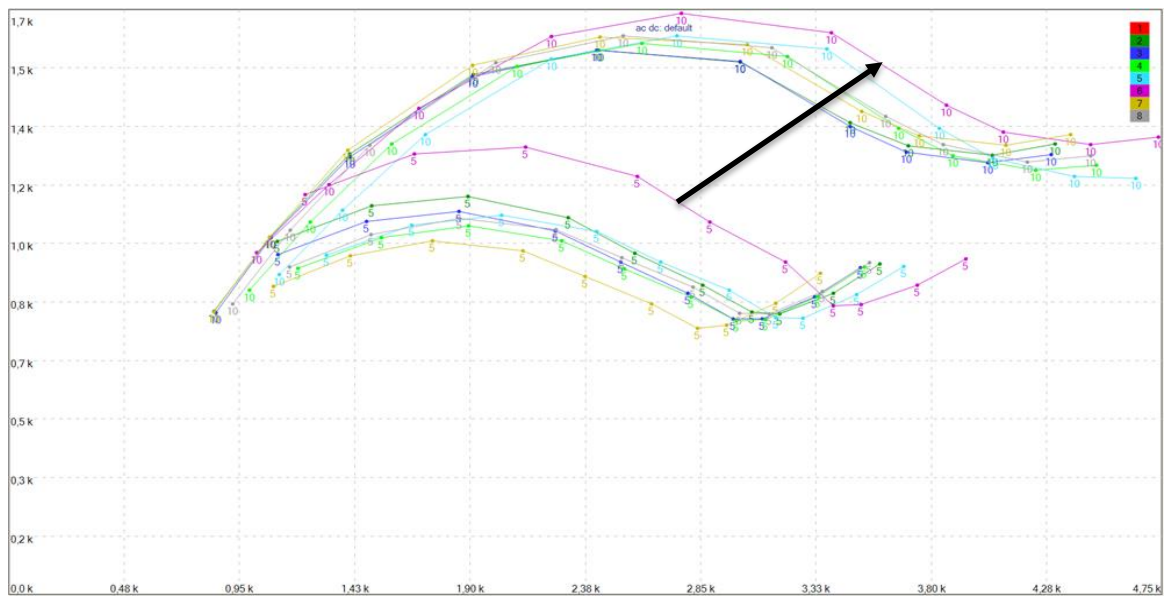
**Rycina S13.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką krewetki tygrysyj zmieszanej z MNV.



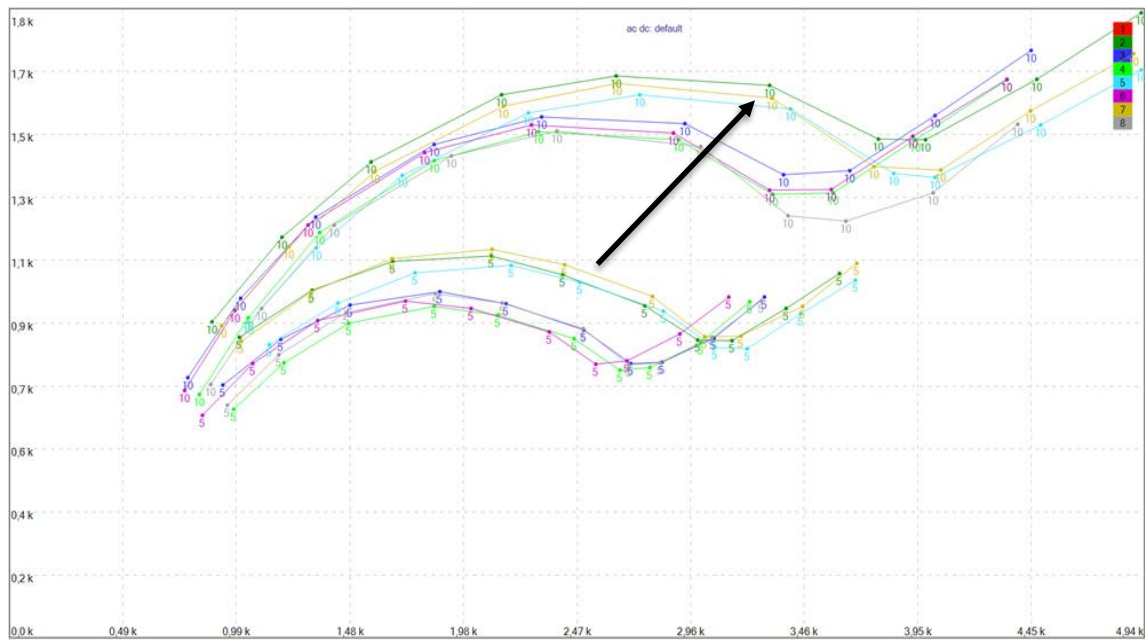
**Rycina S14.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką ostrygi pacyficznej zmieszanej z MNV.



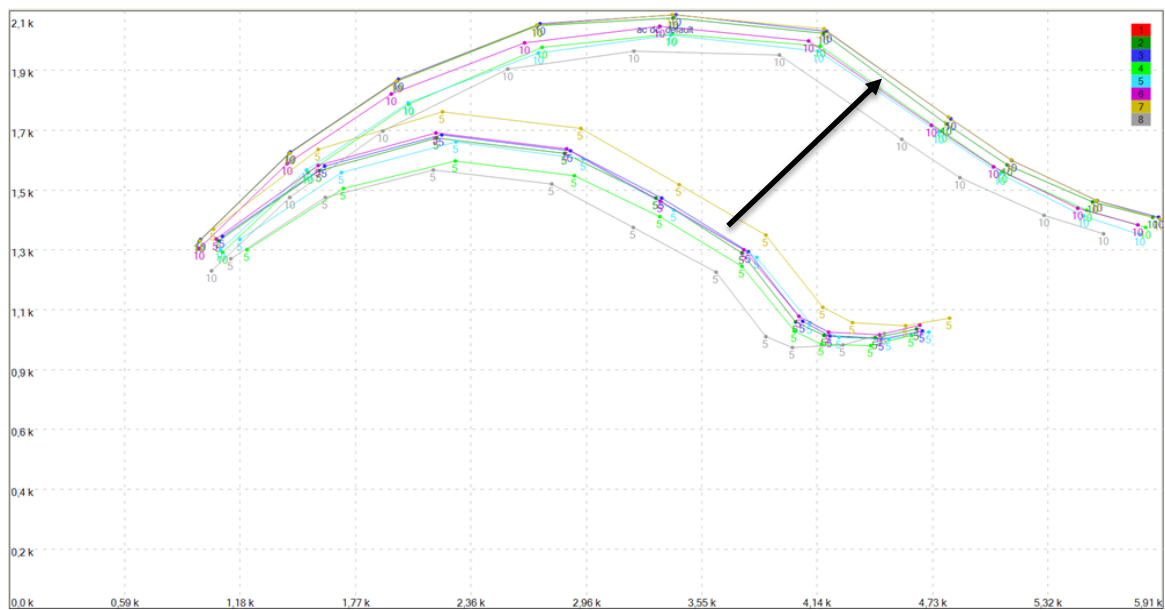
**Rycina S15.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką sałaty lodowej zmieszanej z próbką HuNoV.



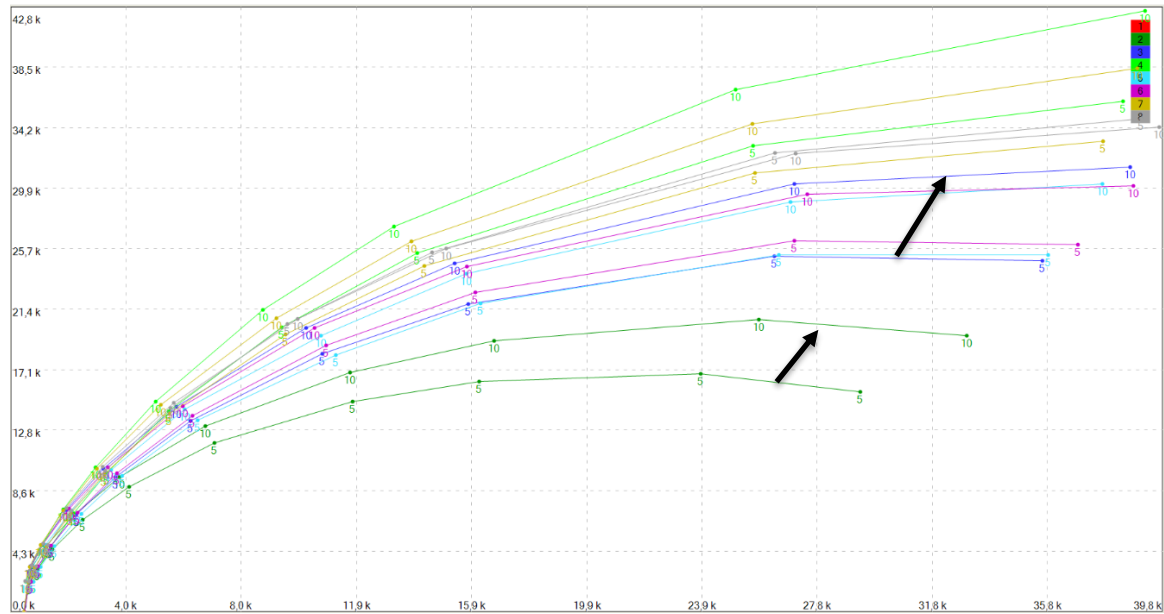
**Rycina S16.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką borówki amerykańskiej zmieszanej z próbką HuNoV.



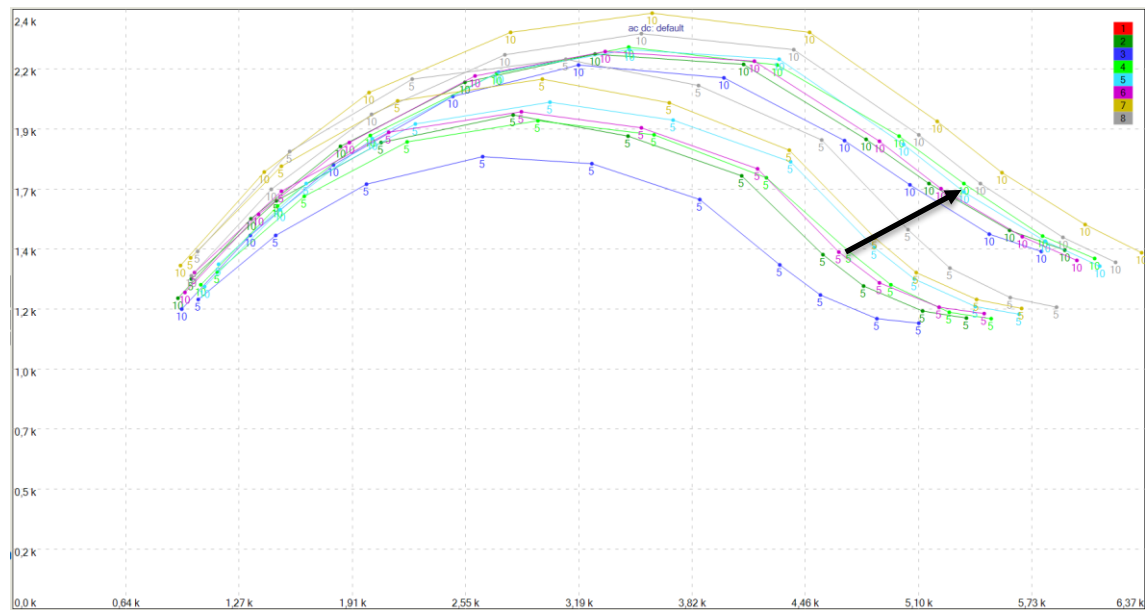
**Rycina S17.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką maliny właściwej zmieszanej z próbką HuNoV.



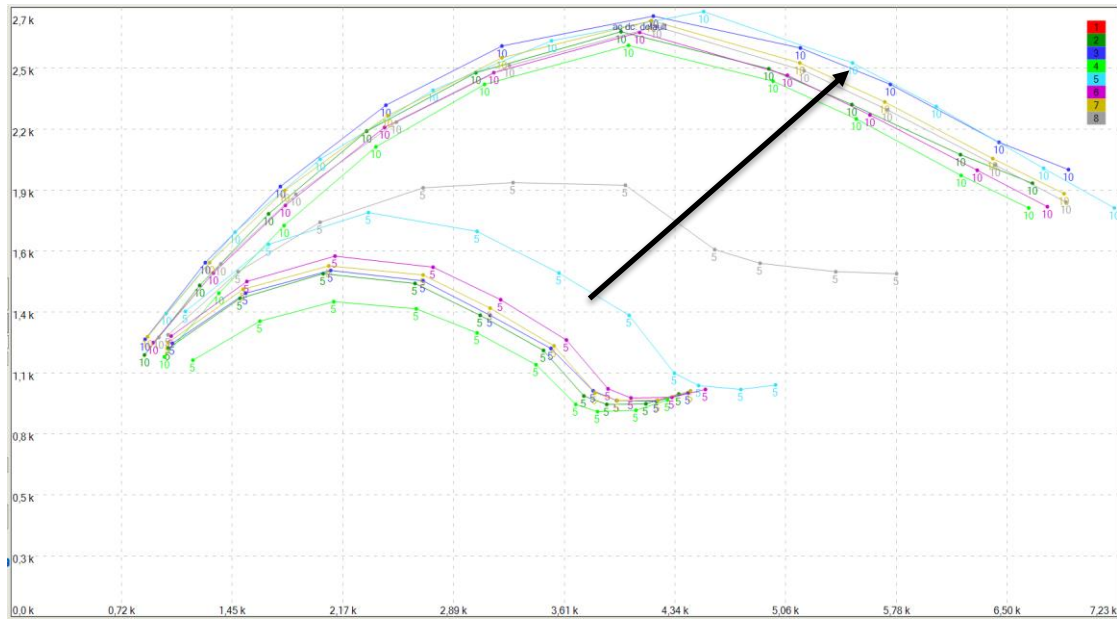
**Rycina S18.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką krewetki tygrysyj zmieszanej z próbką HuNoV.



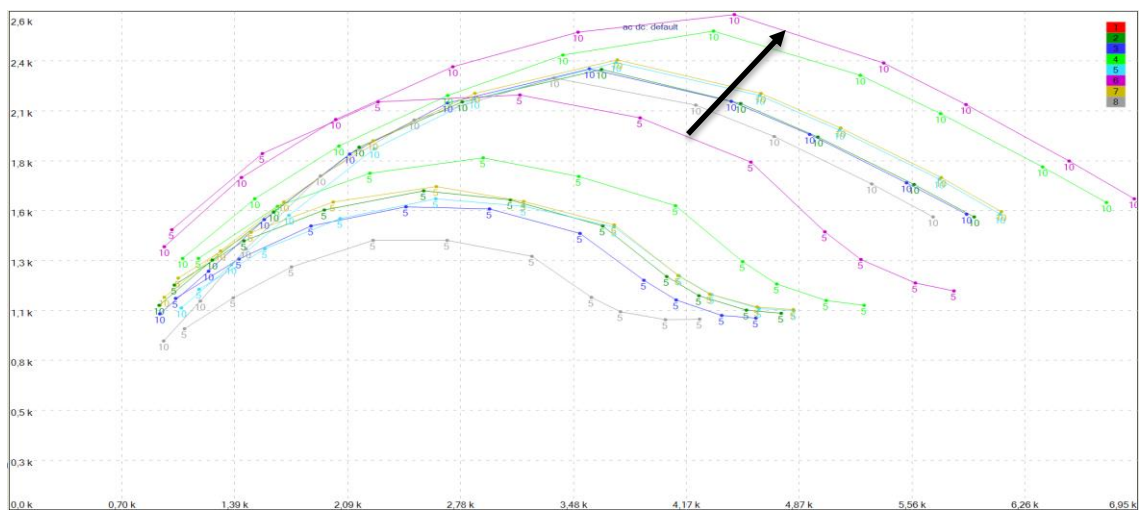
**Rycina S19.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką ostrygi pacyficznej zmieszanej z próbką HuNoV



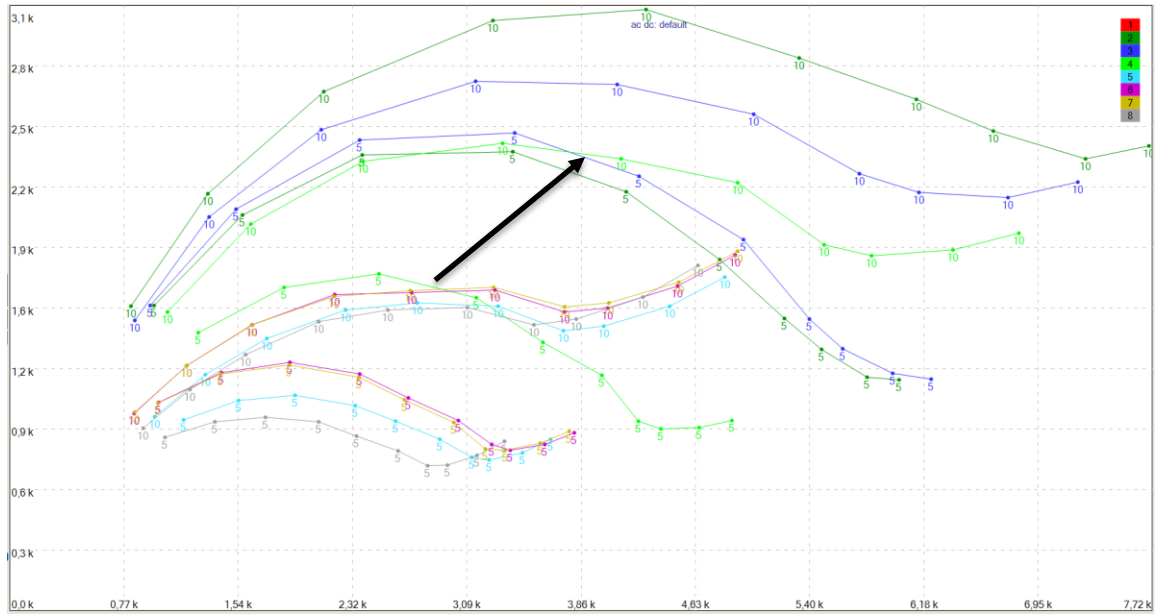
**Rycina S20.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Proteus mirabilis* zmieszanej z MNV.



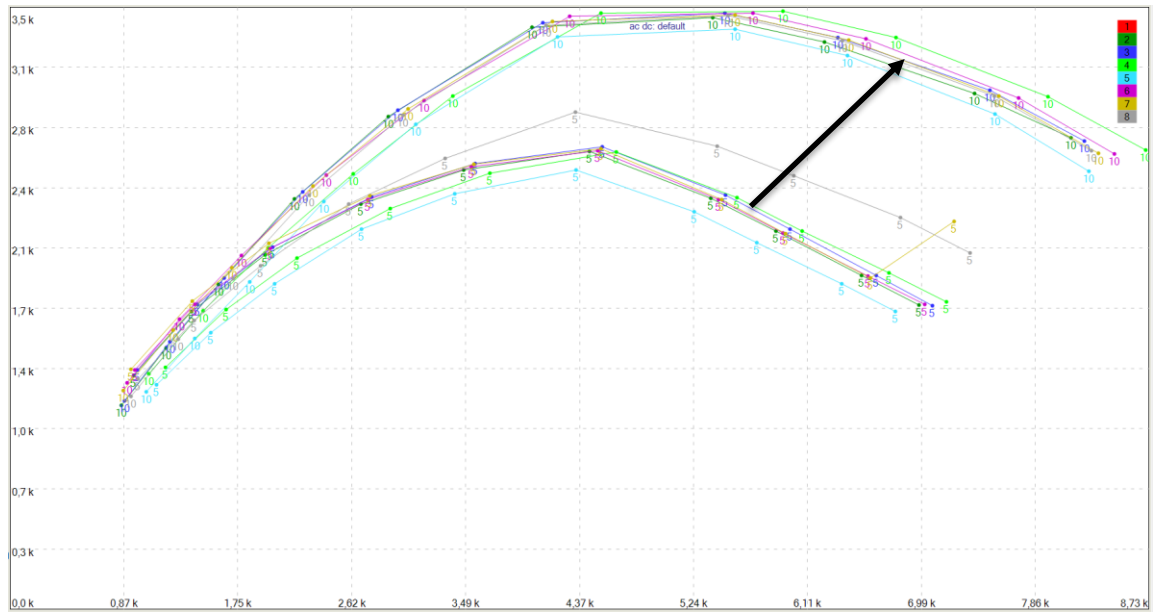
**Rycina S21.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Escherichia coli* zmieszanej z MNV.



**Rycina S22.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Salmonella* spp. zmieszanej z MNV.

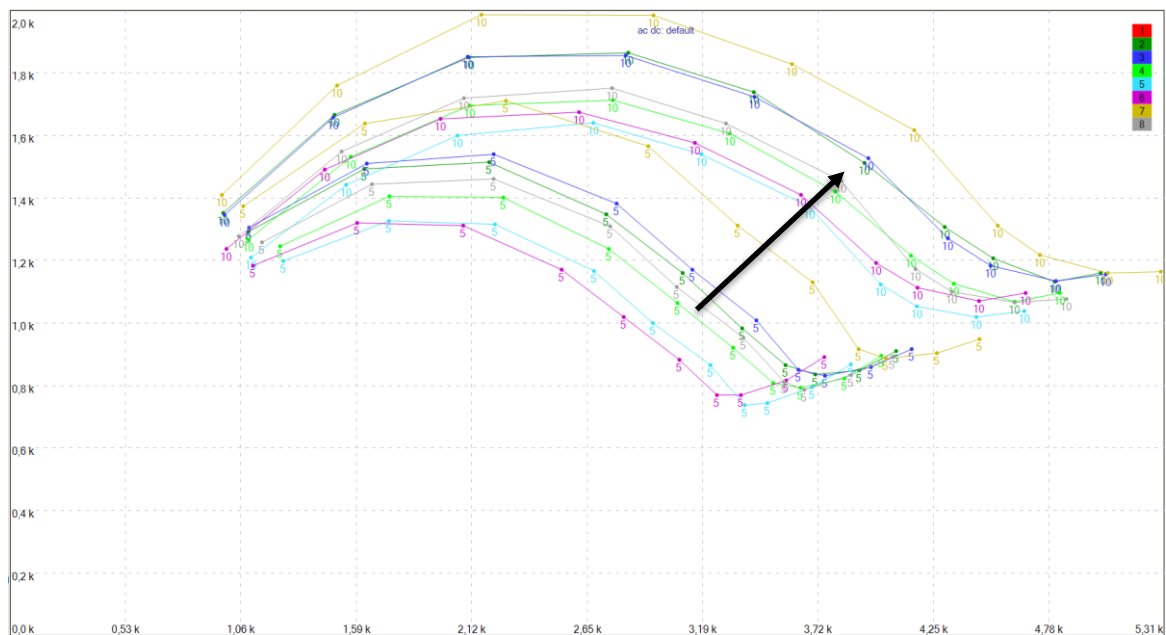


Rycina S23. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Yersinia enterocolitica* zmieszanej z MNV.

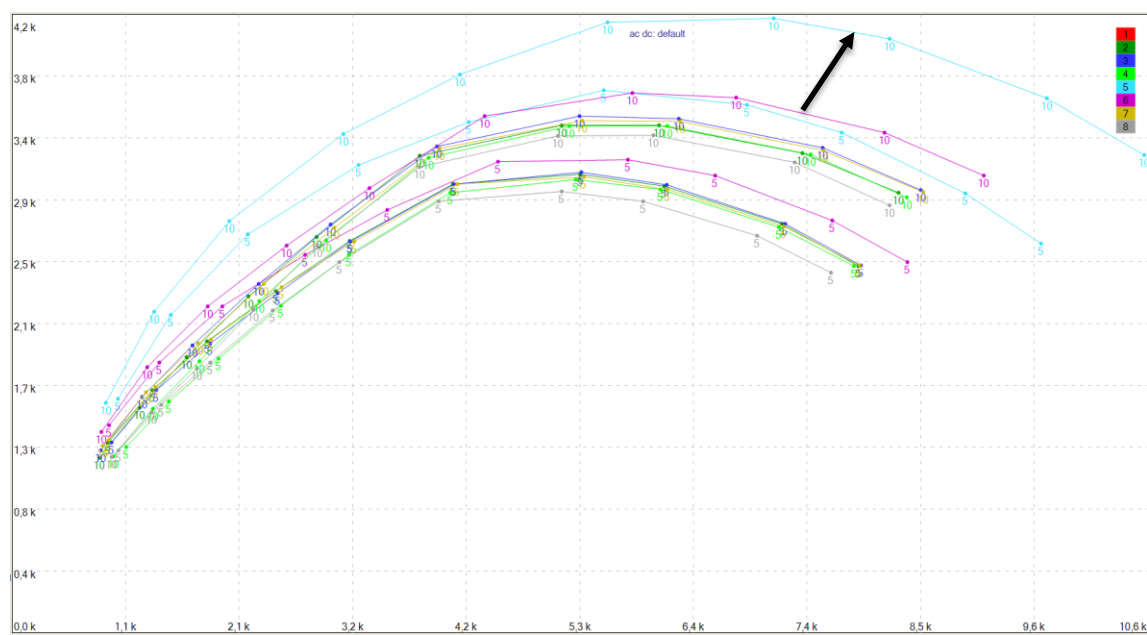


Rycina S24. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Klebsiella pneumoniae* zmieszanej z MNV.

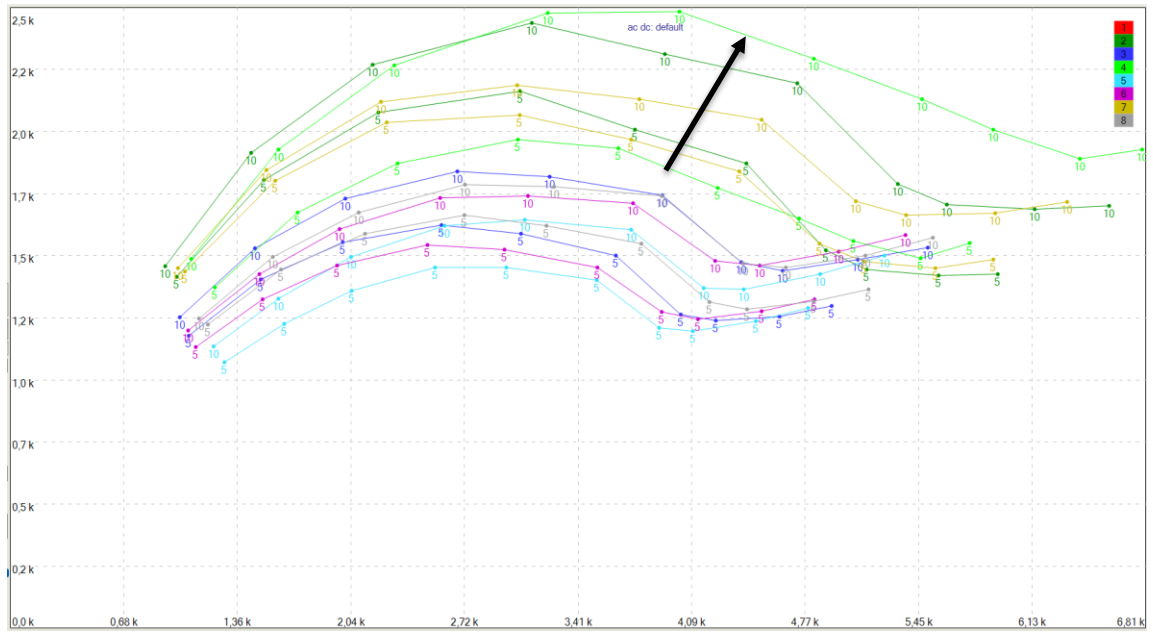




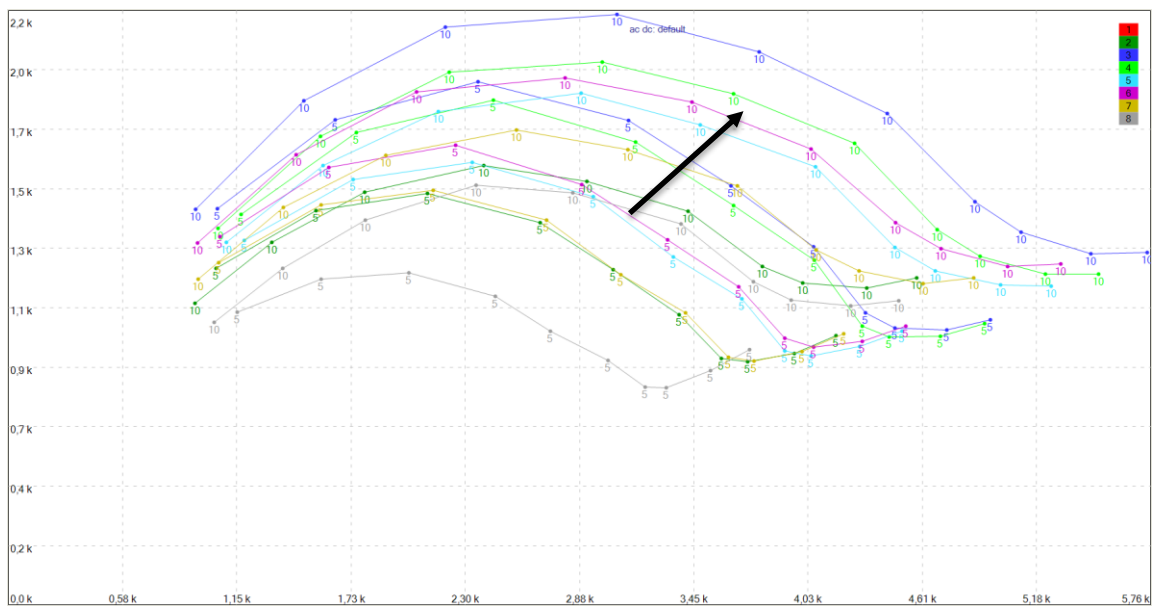
**Rycina S25.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Proteus mirabilis* zmieszanej z próbką HuNoV.



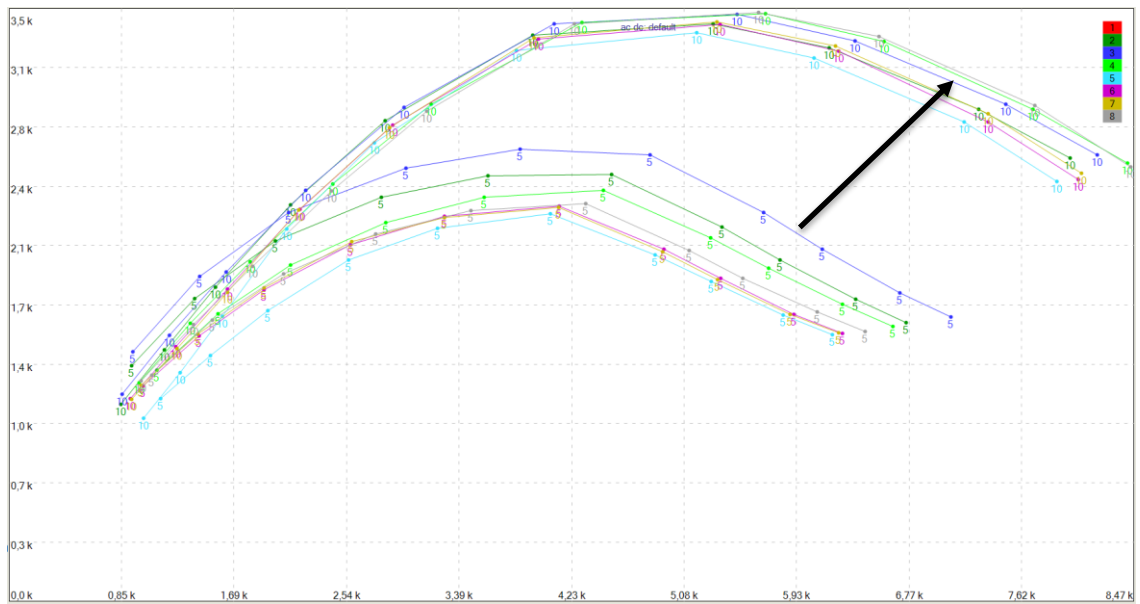
**Rycina S26.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Escherichia coli* zmieszanej z próbką HuNoV.



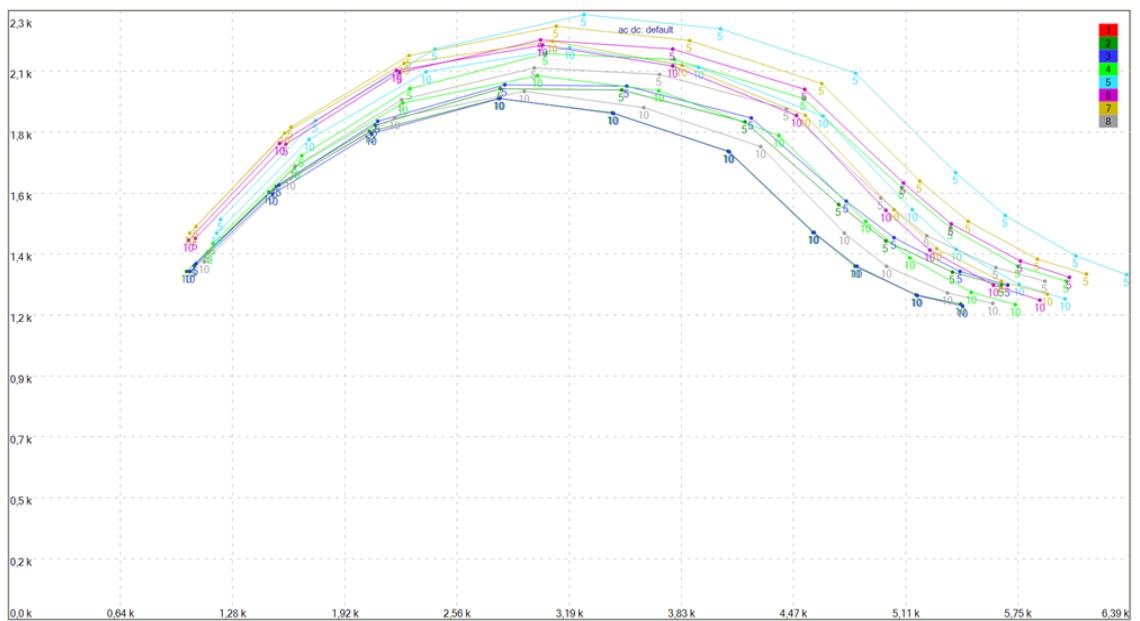
Rycina S27. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Salmonella* spp. zmieszanej z próbką HuNoV.



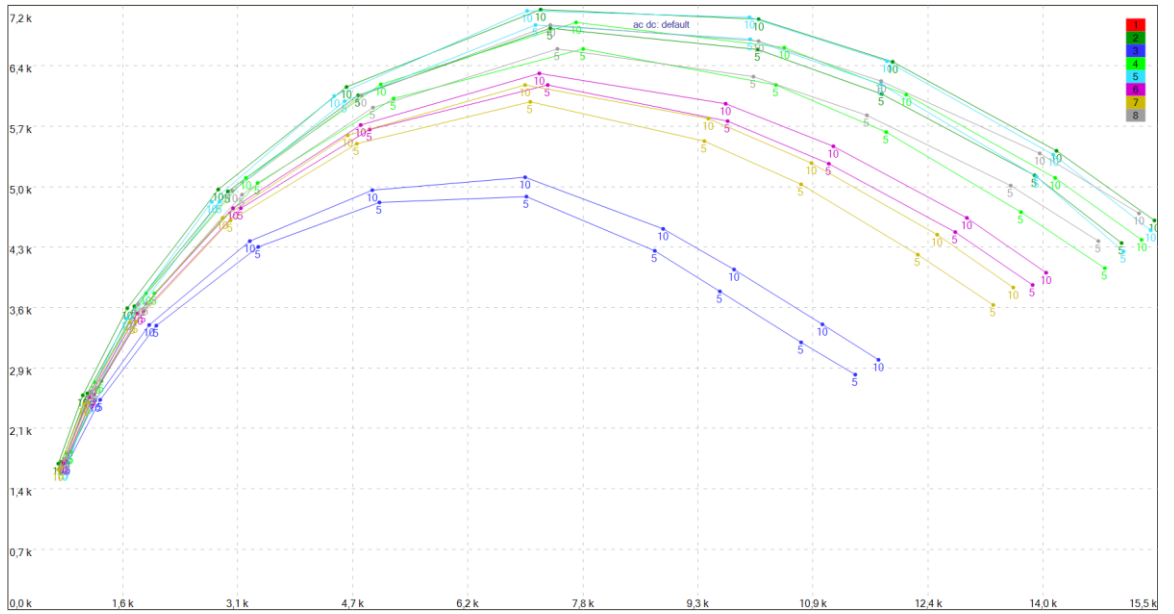
Rycina S28. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Yersinia enterocolitica* zmieszanej z próbką HuNoV.



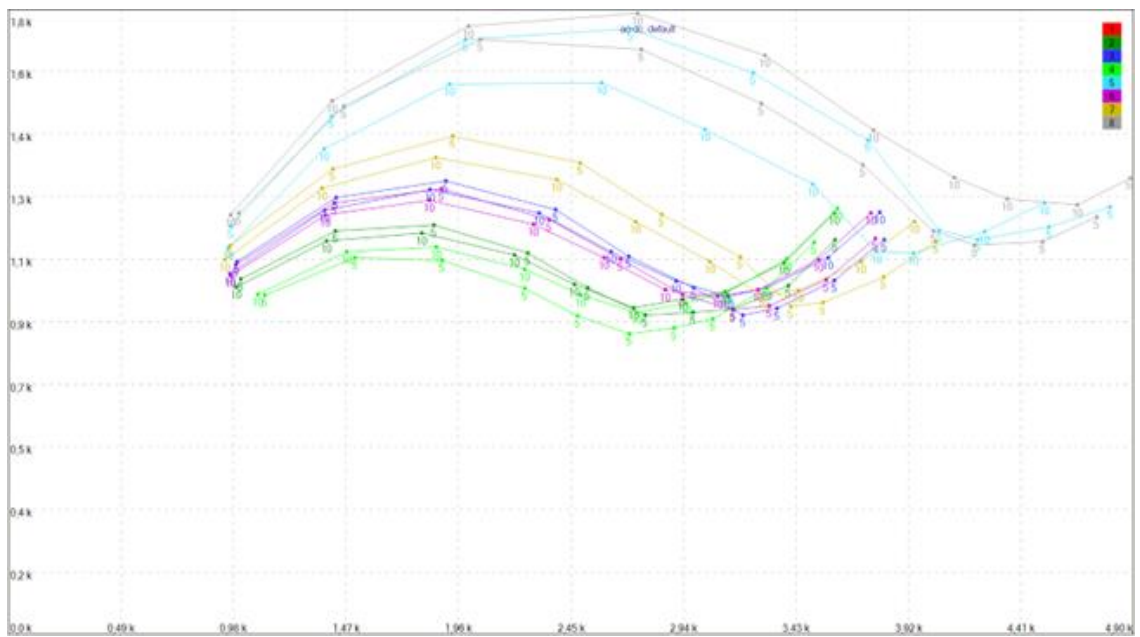
**Rycina S29.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Klebsiella pneumoniae* zmieszanej z próbką HuNoV.



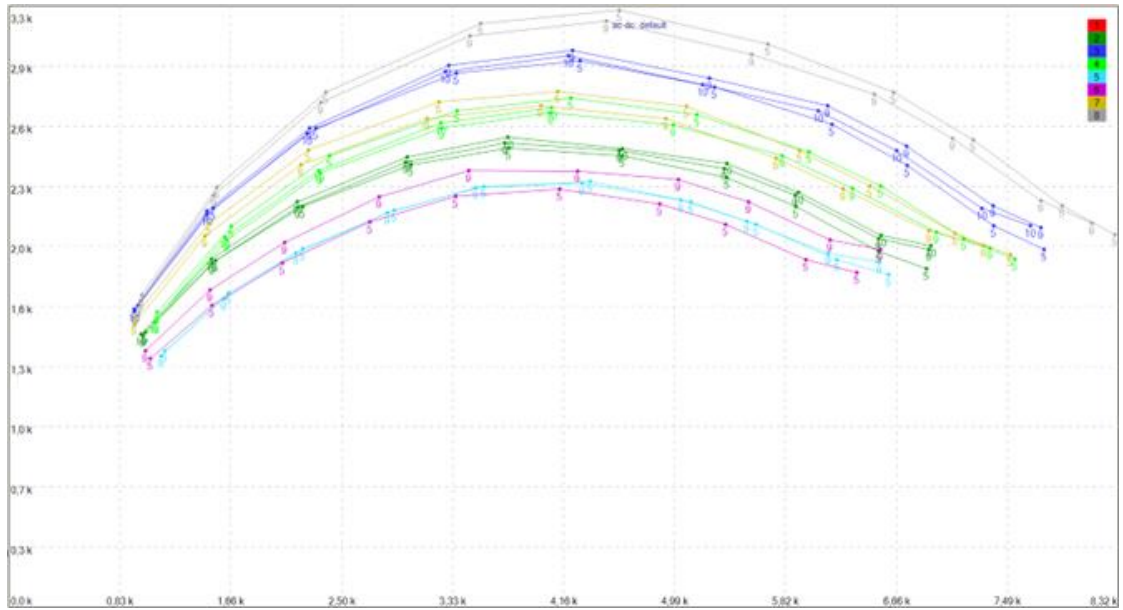
**Rycina S30.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.



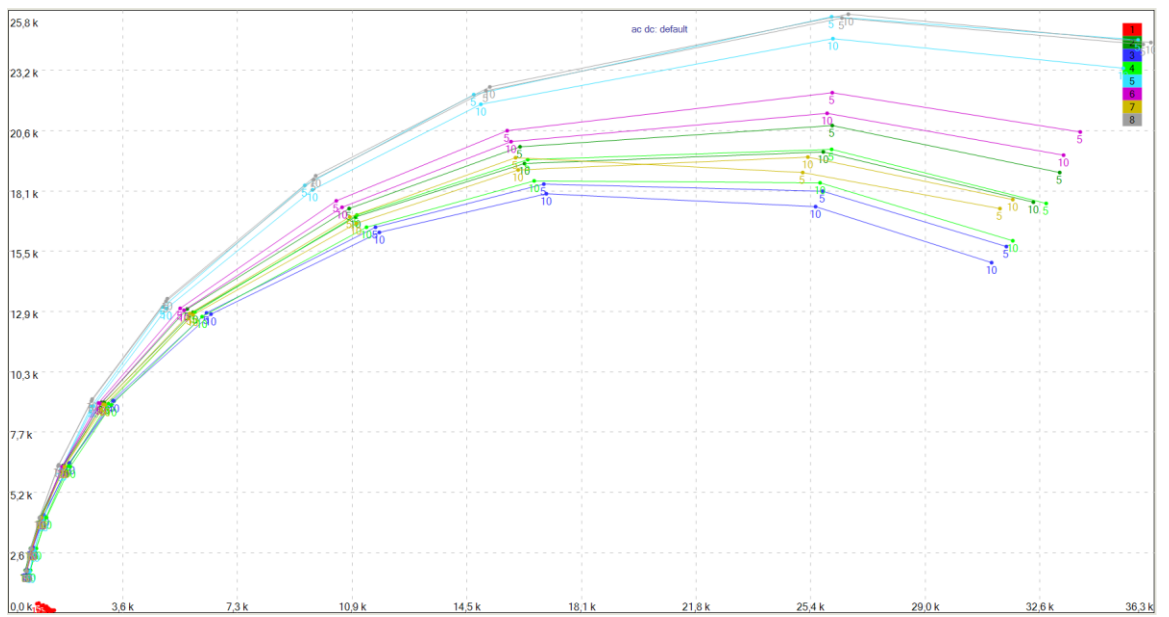
Rycina S31. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.



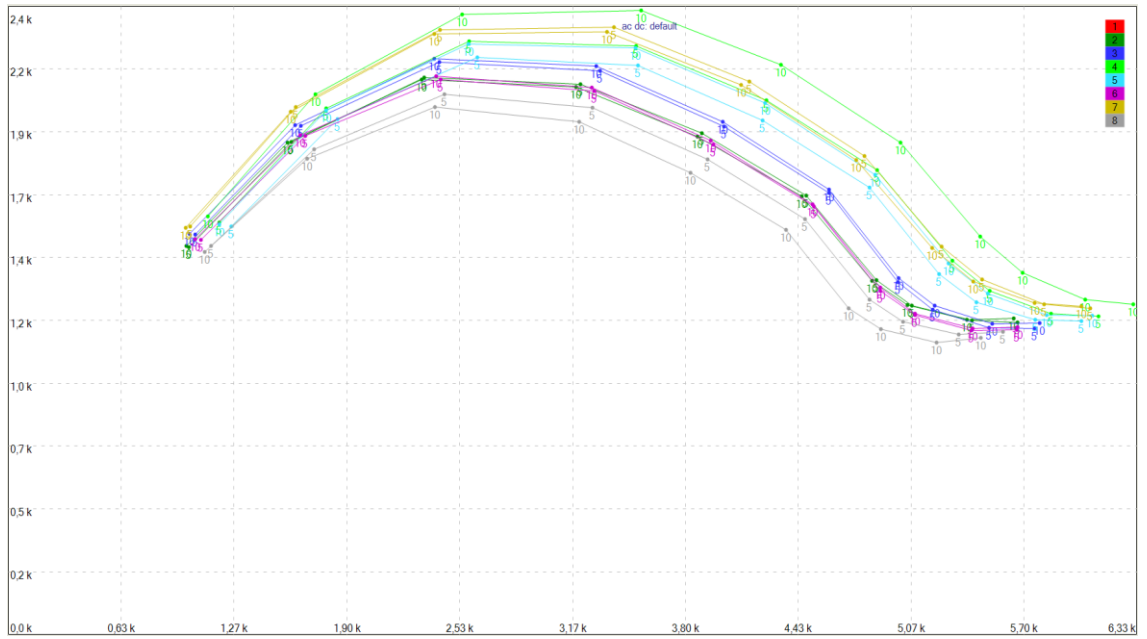
Rycina S32. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką sałaty lodowej.



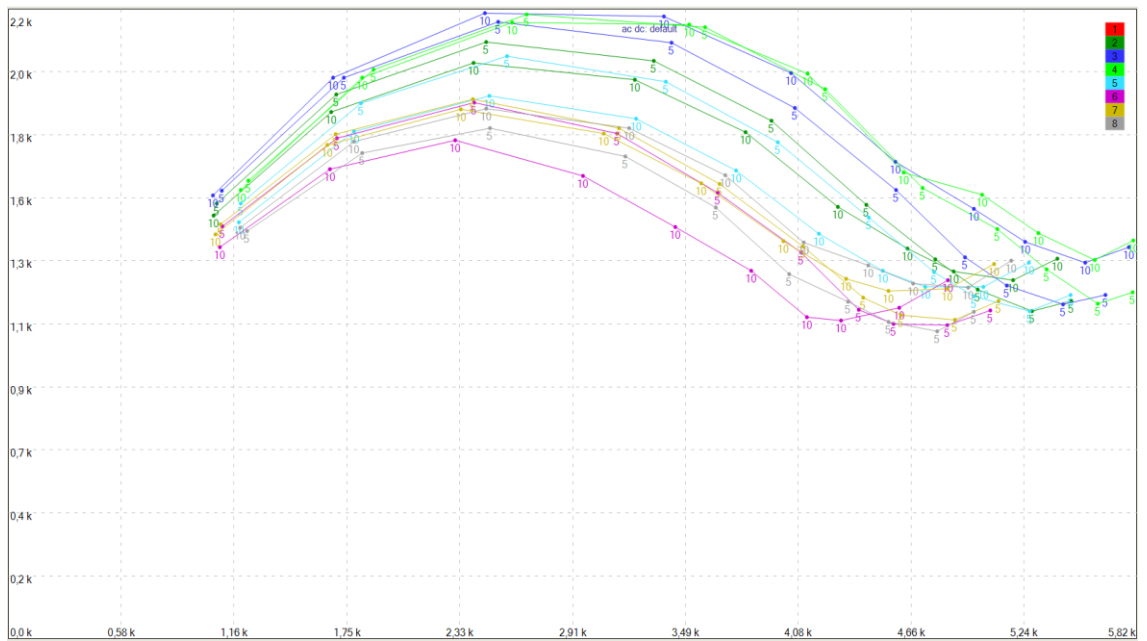
Rycina S33. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką borówki amerykańskiej.



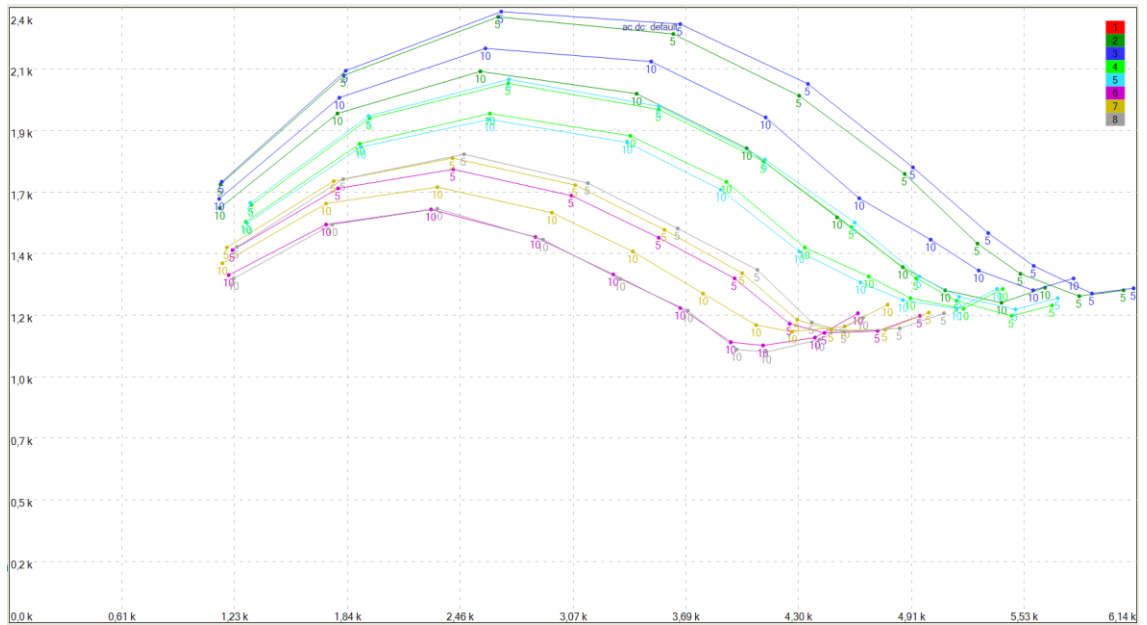
Rycina S34. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką maliny właściwej.



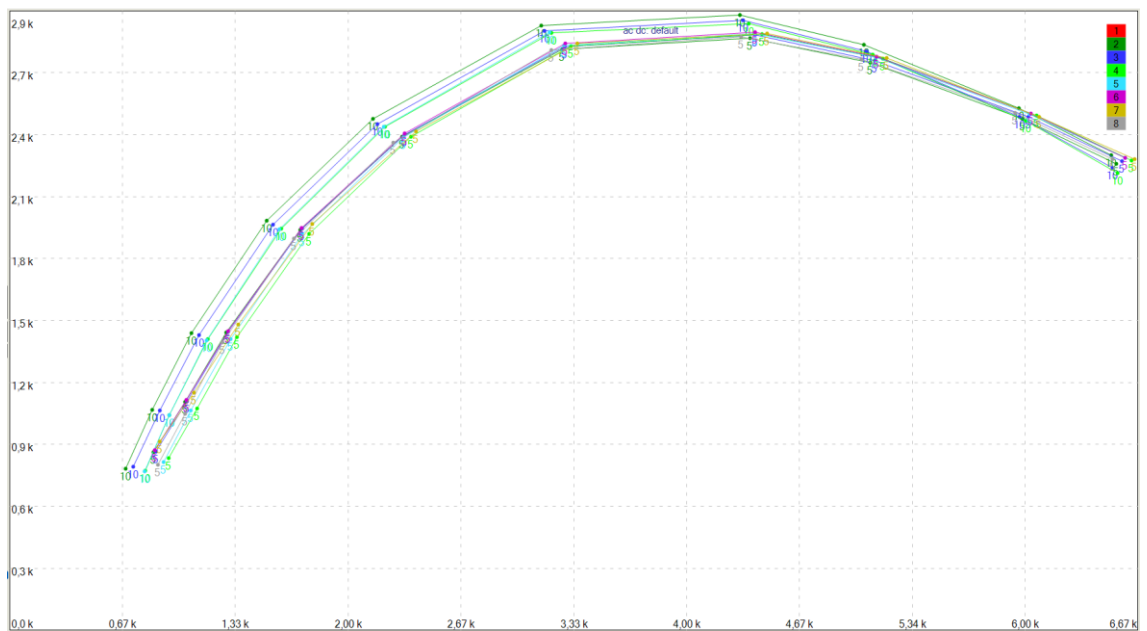
Rycina S35. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką krewetki tygryziej.



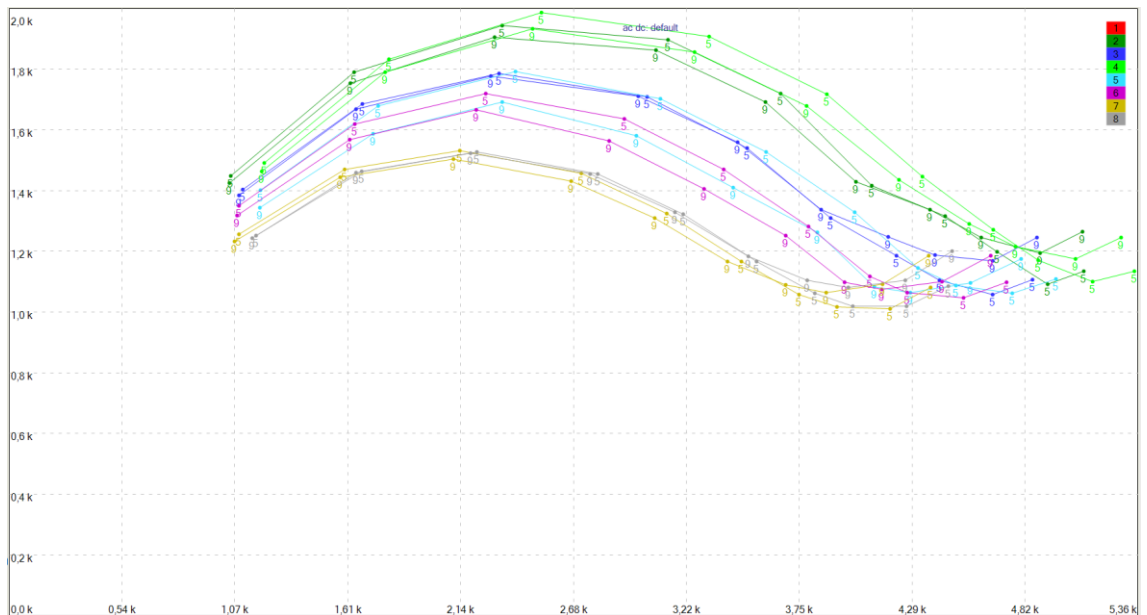
Rycina S36. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką ostrygi pacyficznej.



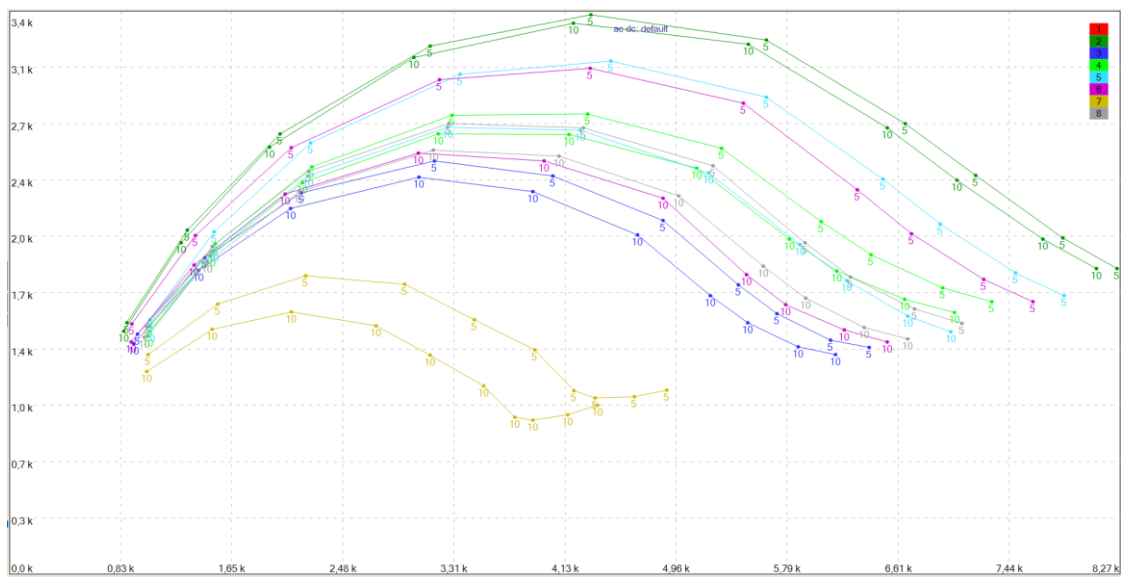
**Rycina S37.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką sałaty lodowej zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.



**Rycina S38.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką borówki amerykańskiej zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.

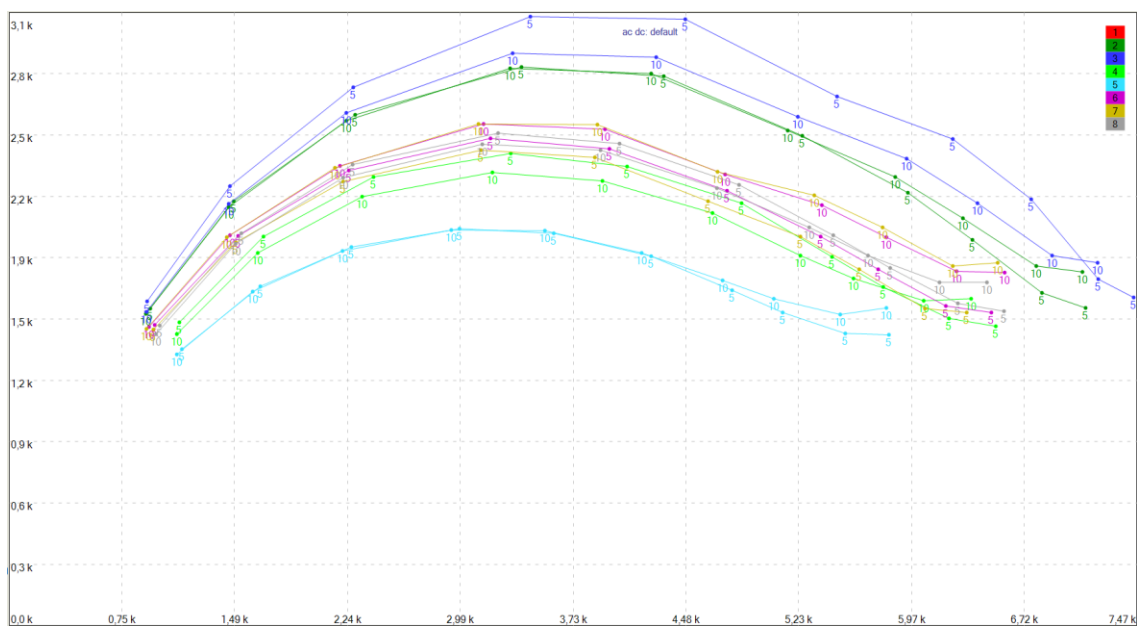


**Rycina S39.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką maliny właściwej zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.

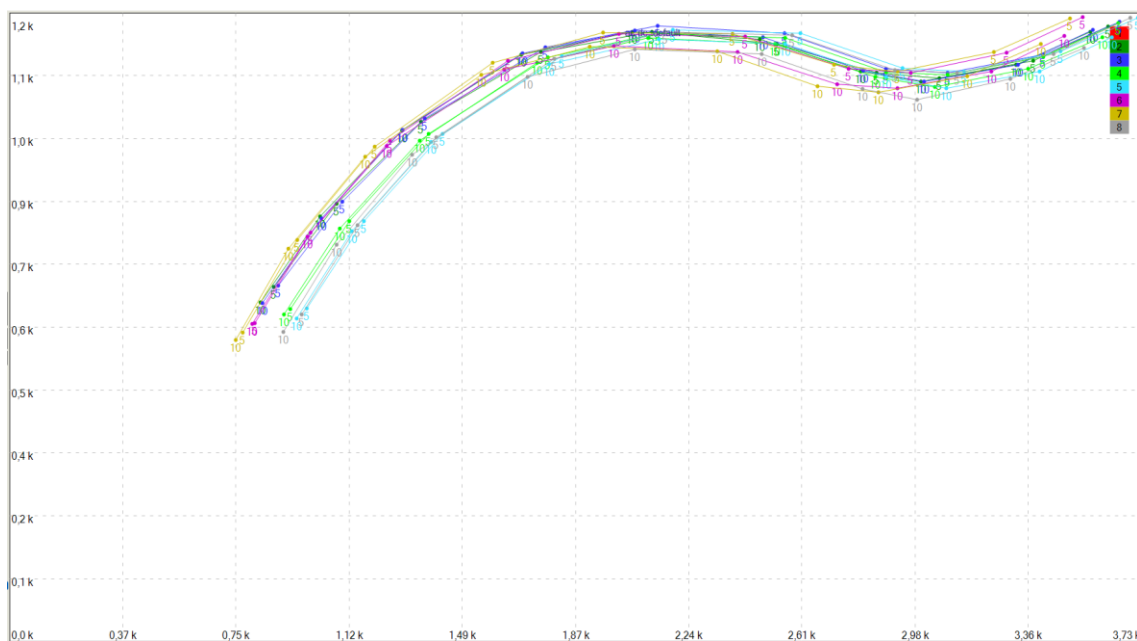


**Rycina S40.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką krewetki tygrysyj zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.

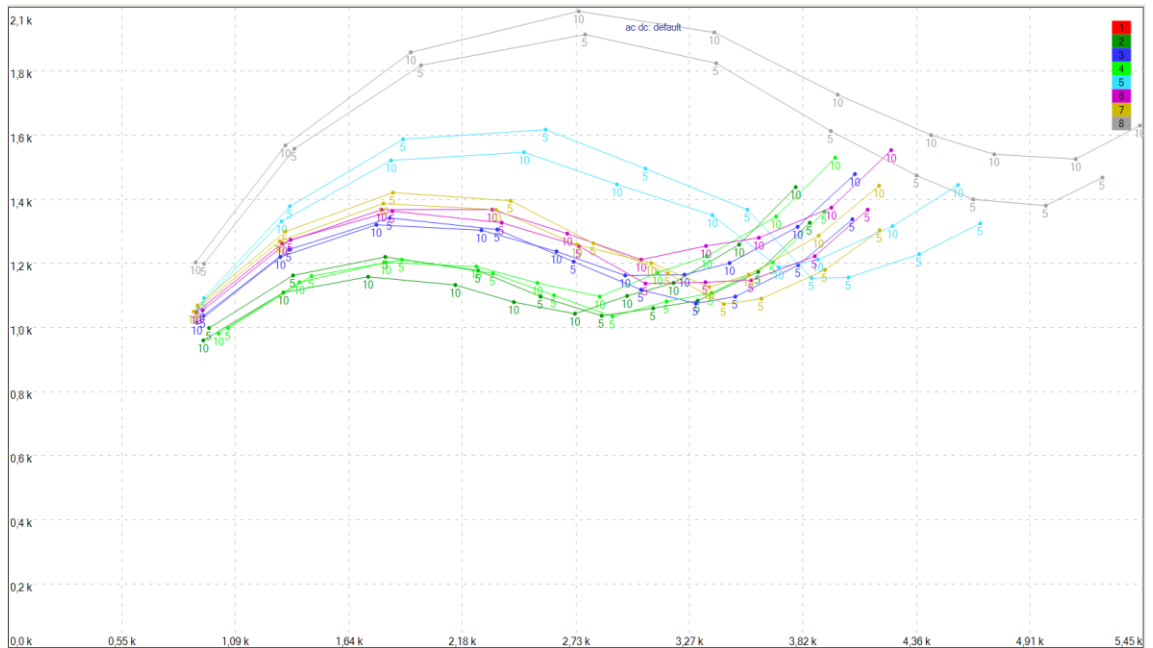




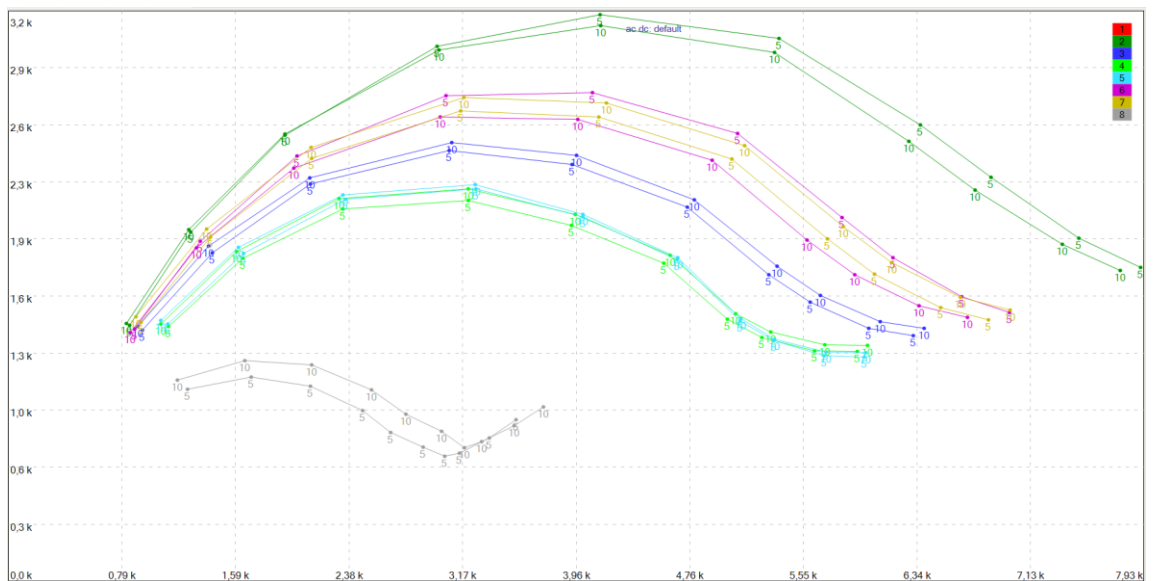
**Rycina S41.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką ostrygi pacyficznej zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.



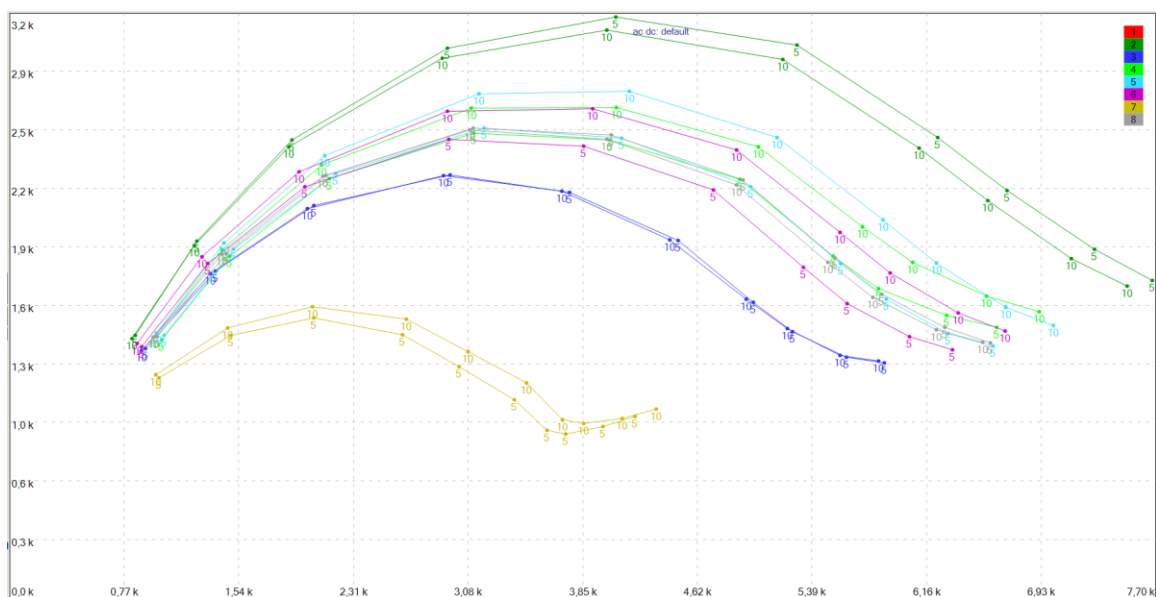
**Rycina S42.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką sałaty lodowej zmieszanej z płynem, w którym był zawieszony HuNoV.



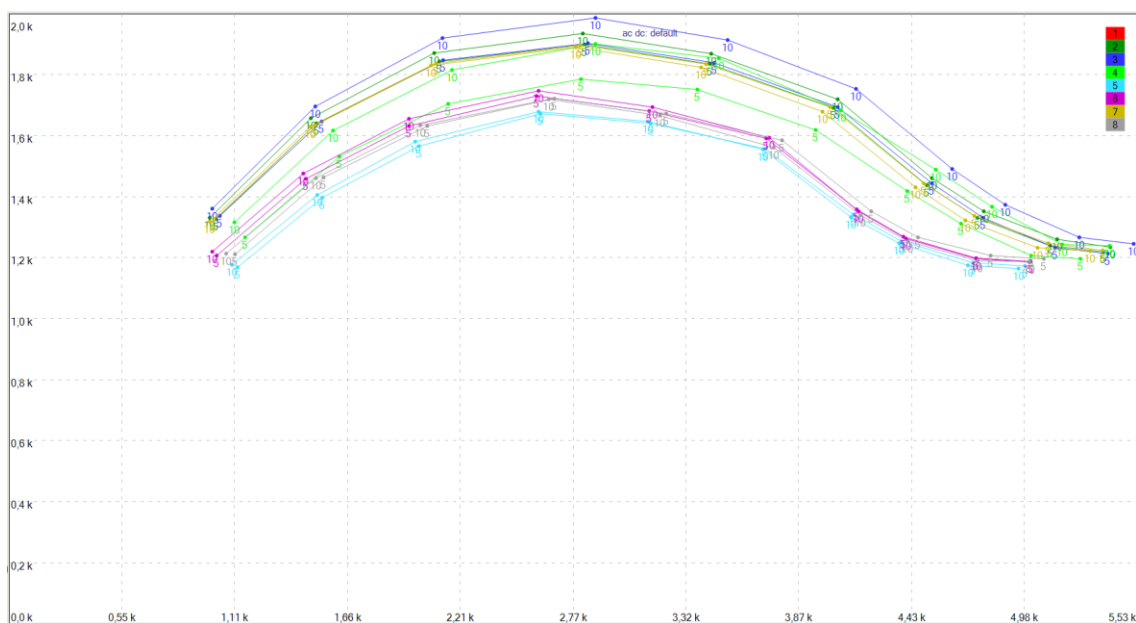
**Rycina S43.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką borówki amerykańskiej zmieszanej z próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.



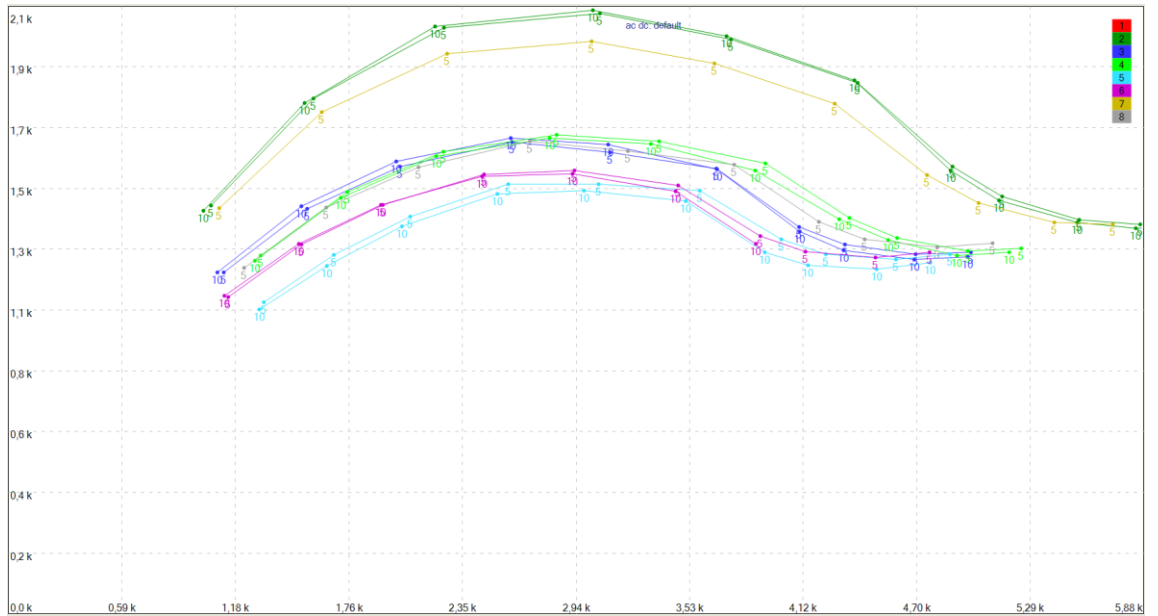
**Rycina S44.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką maliny właściwej zmieszanej z próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.



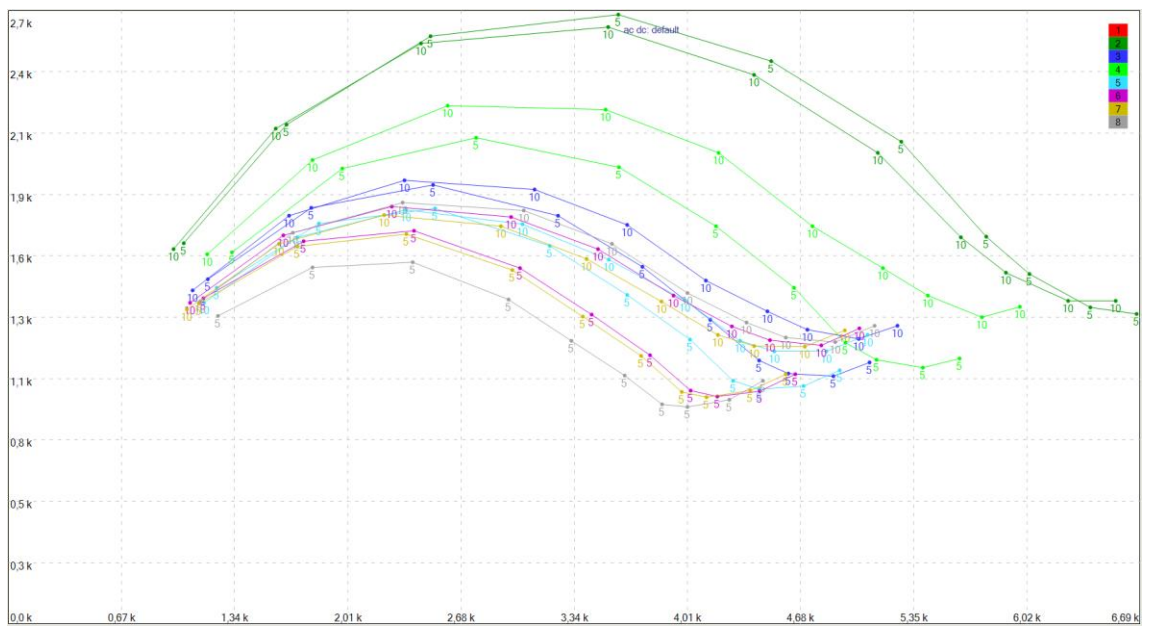
**Rycina S45.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką krewetki tygrysyj zmieszanej z próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.



**Rycina S46.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką ostrygi pacyficznej zmieszanej z próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.

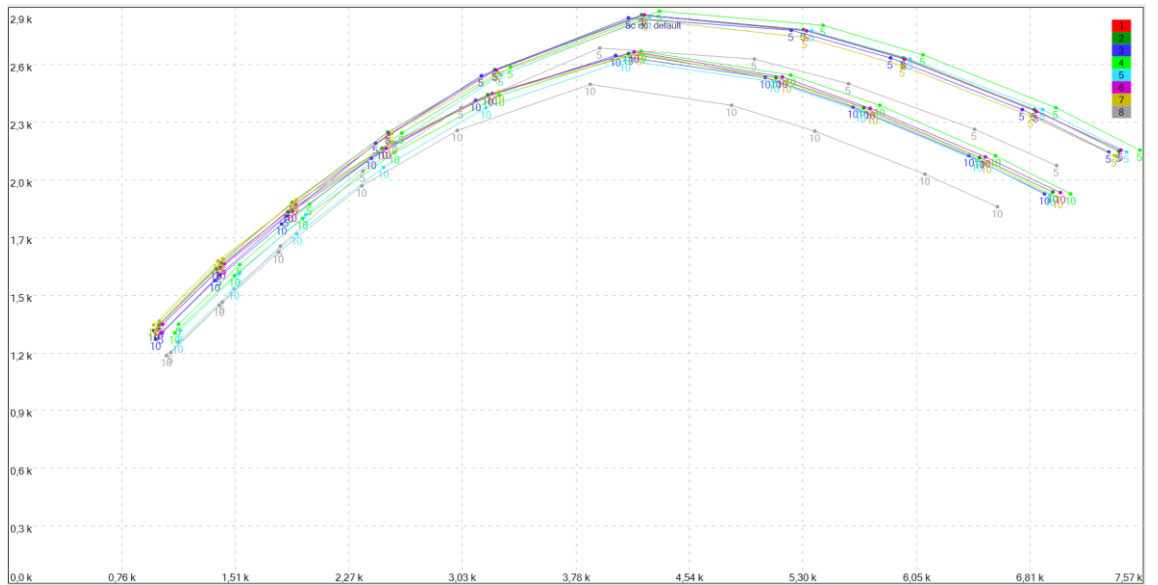


Rycina S47. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Proteus mirabilis*.

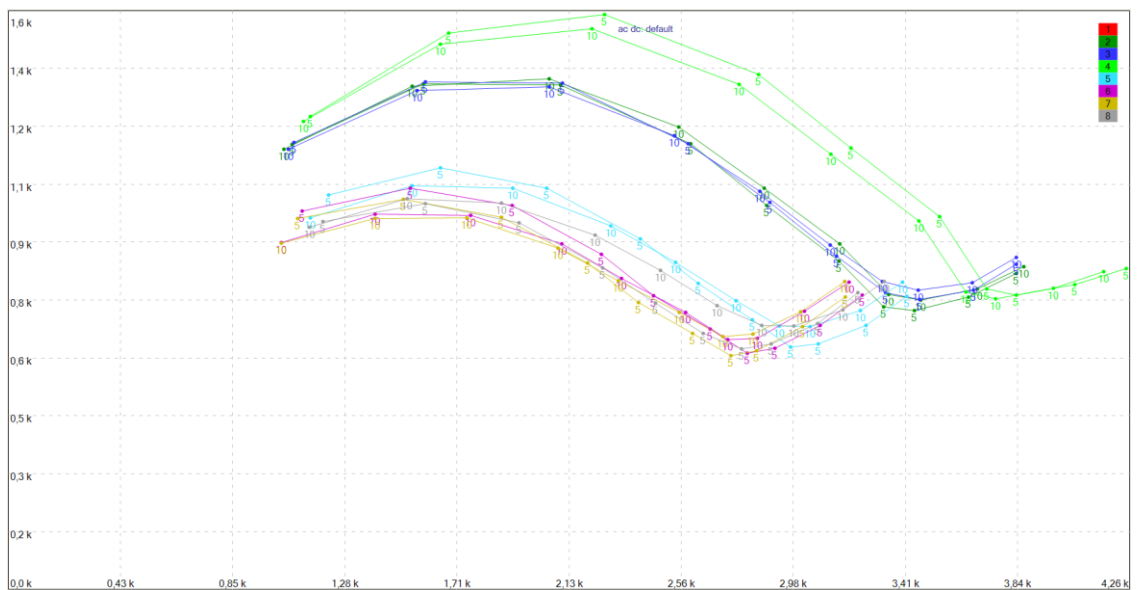


Rycina S48. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Escherichia coli*.

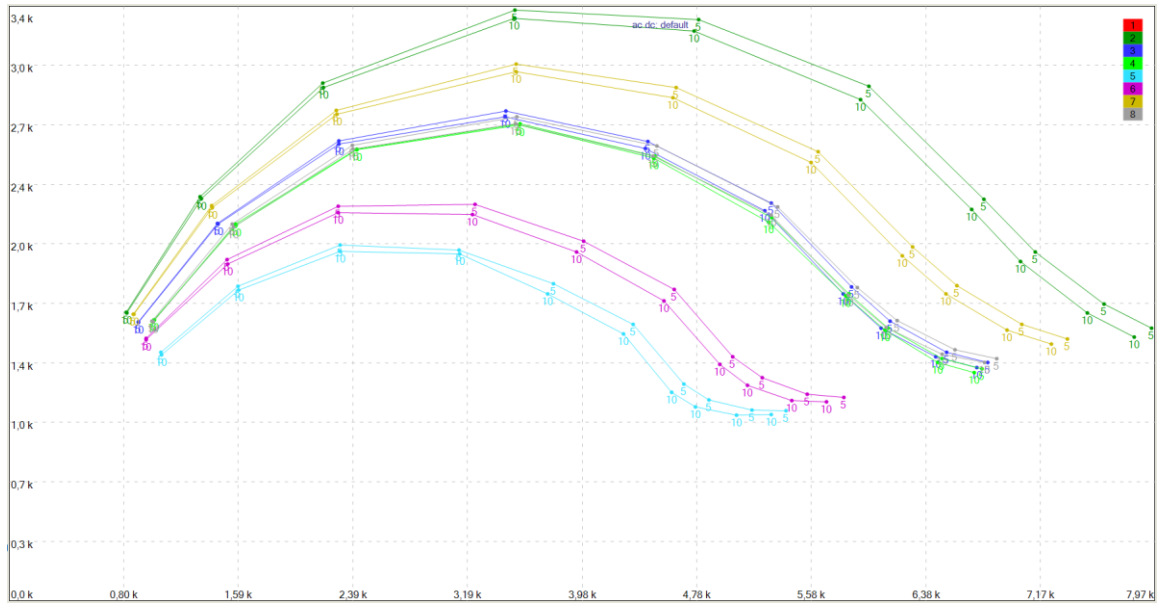




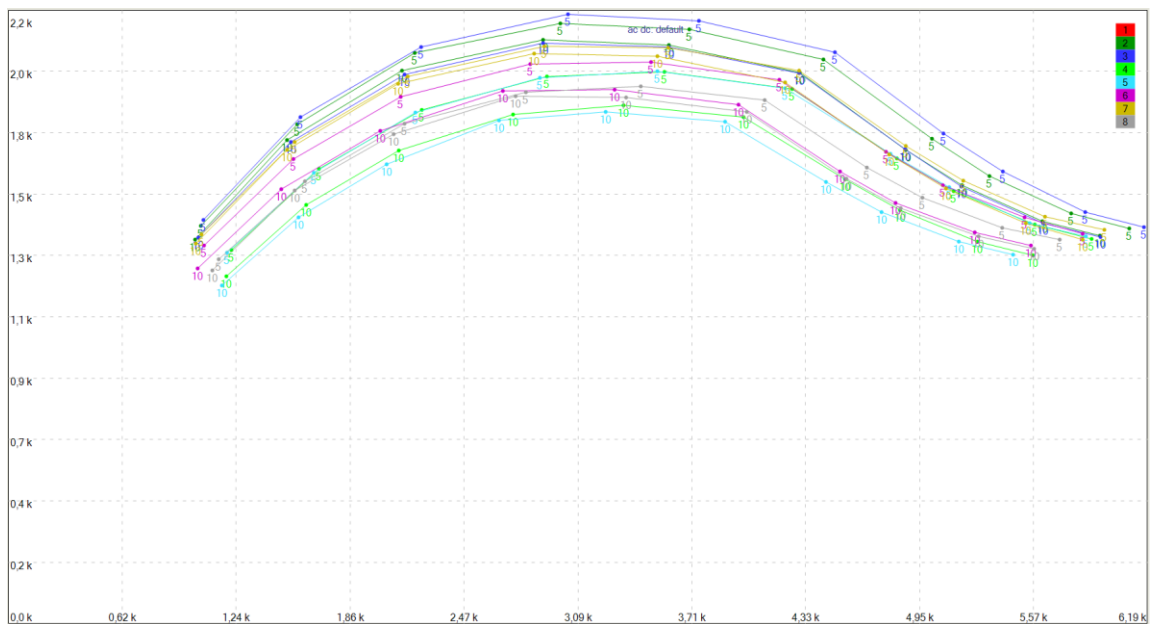
Rycina S51. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Klebsiella pneumoniae*.



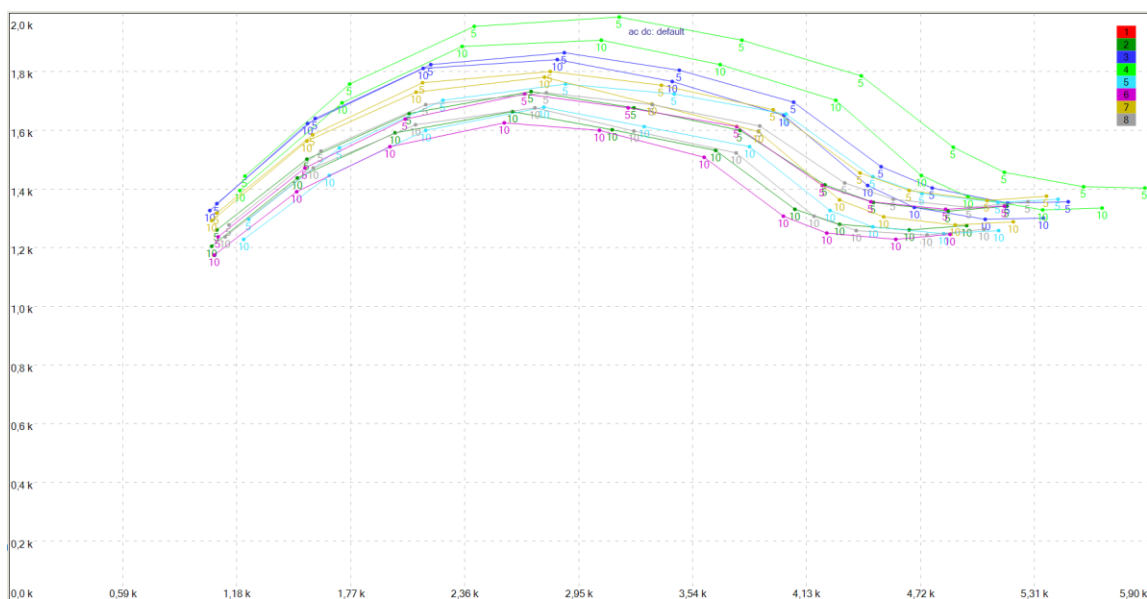
Rycina S52. Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Proteus mirabilis* zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.



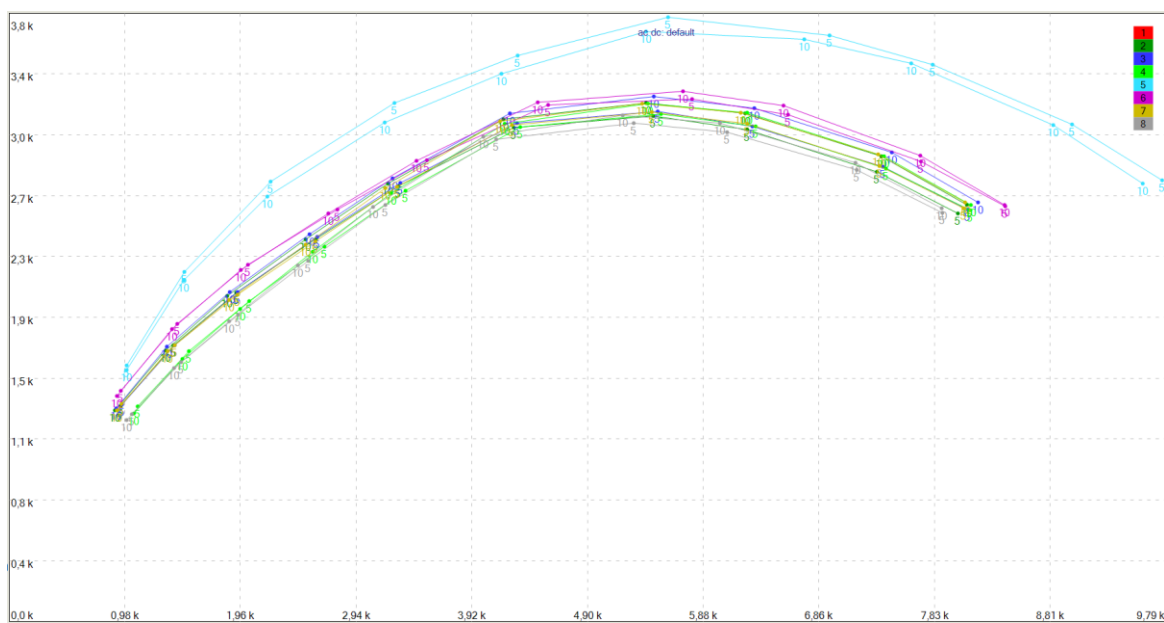
**Rycina S53.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Escherichia coli* zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.



**Rycina S54.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Salmonella* spp. zmieszanej z próbką płynu znad hodowli komórek RAW 264.7.

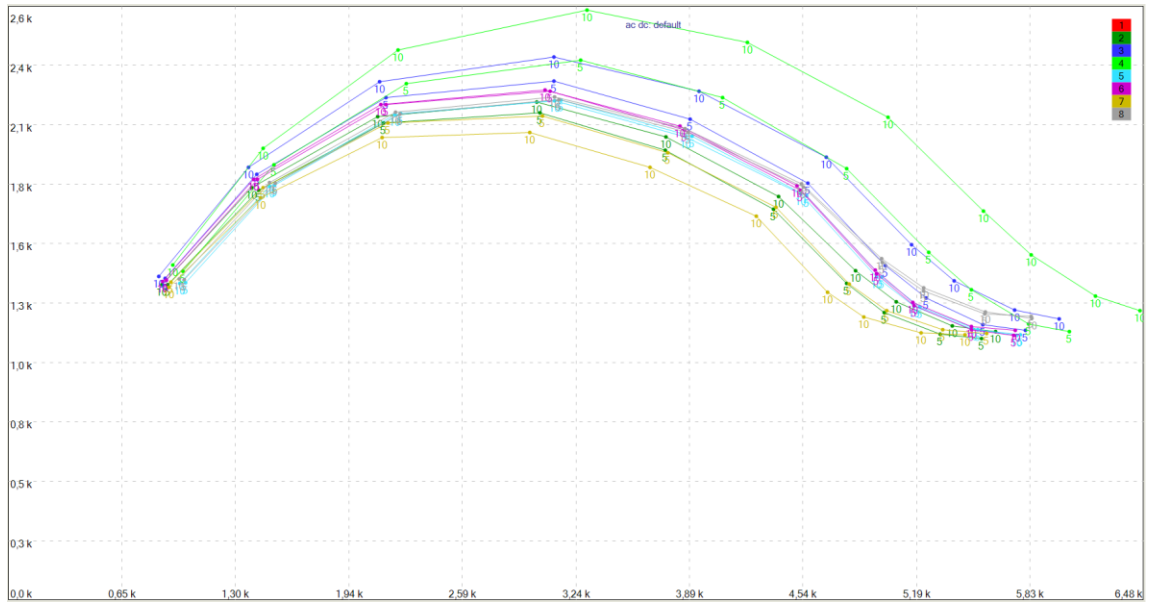


**Rycina S55.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Yersinia enterocolitica* zmieszanej z próbką płynu z nad hodowli komórek RAW 264.7.

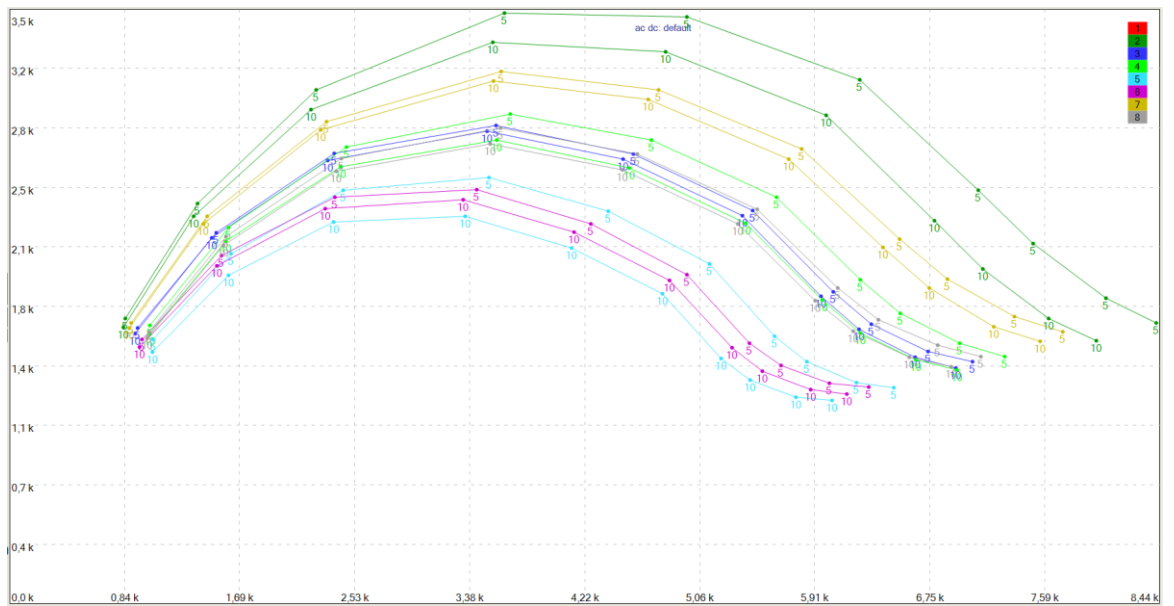


**Rycina S56.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Klebsiella pneumoniae* zmieszanej z próbką płynu z nad hodowli komórek RAW 264.7.

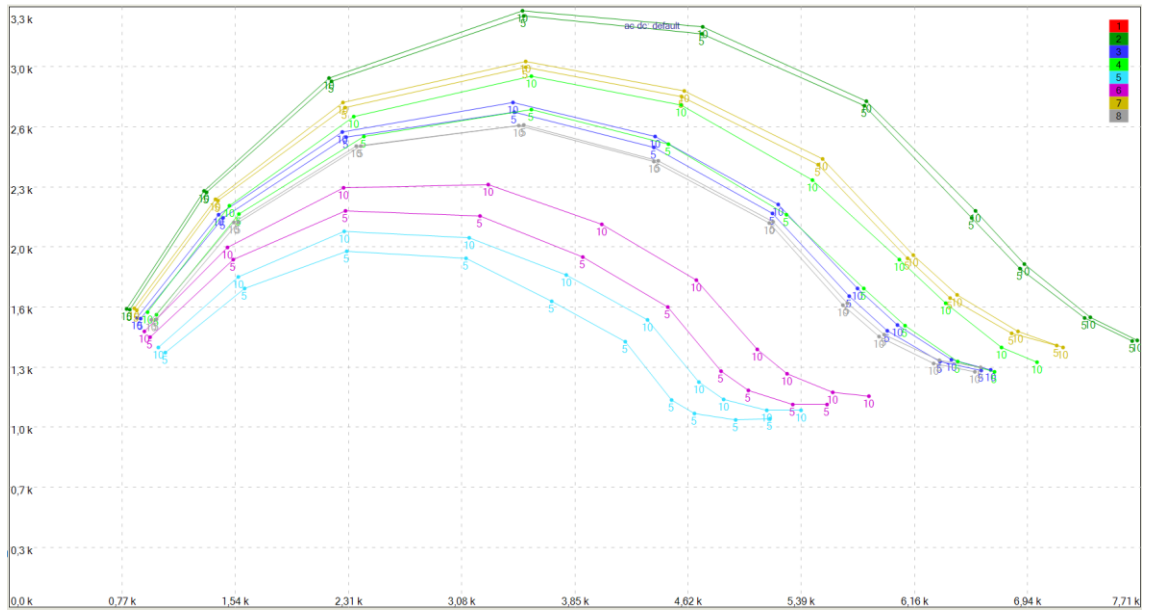




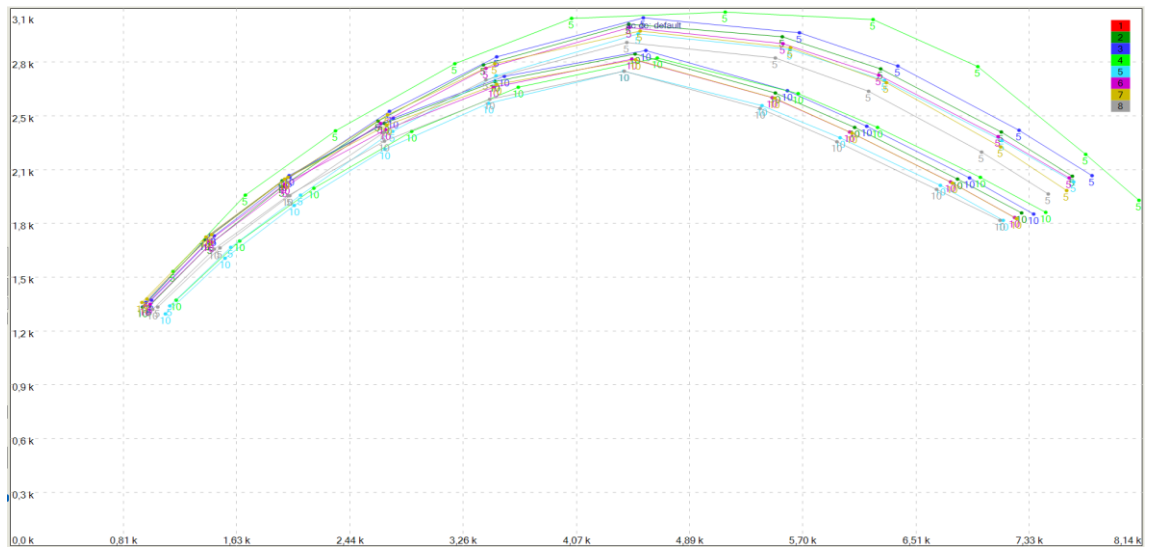
**Rycina S57.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Proteus mirabilis* zmieszaną z próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.



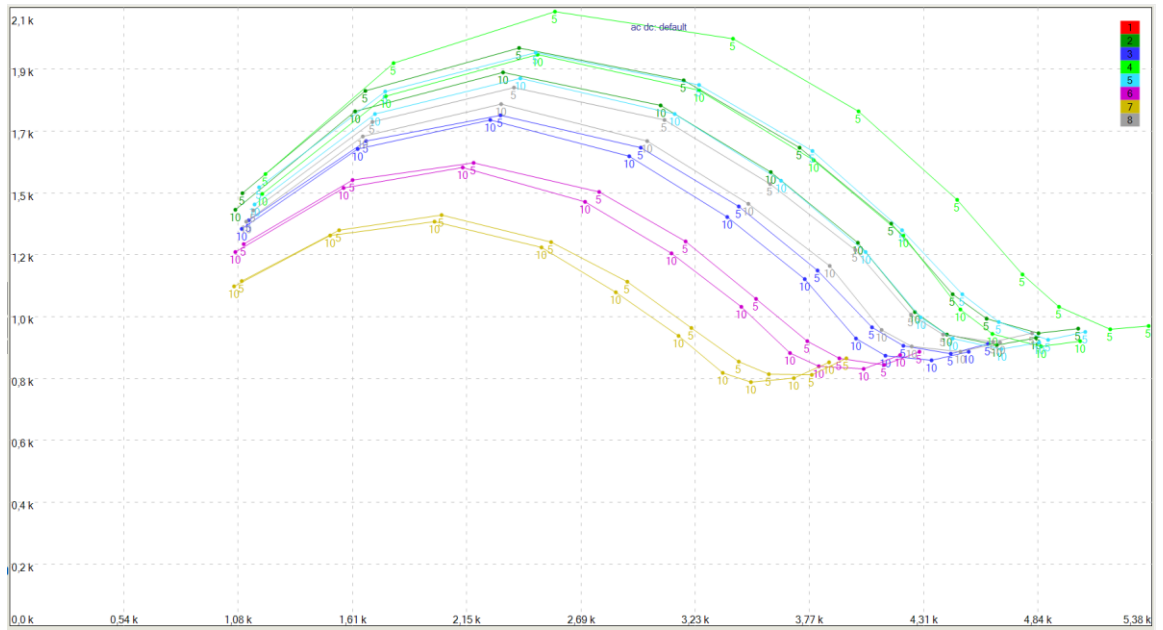
**Rycina S58.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Escherichia coli* zmieszaną z próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.



**Rycina S59.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Salmonella* spp. zmieszaną z próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.






**Rycina S60.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Yersinia enterocolitica* ze zmieszaną próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.



**Rycina S61.** Przykładowy wykres dla testu z nałożoną próbką *Klebsiella pneumoniae* ze zmieszaną próbką płynu, w którym był zawieszony HuNoV.

Zwalidowany test został wdrożony do oferty firmy Food4Future Technologies (Ryc. S62).

Przed jakimi patogenami chorobotwórczymi  
możesz uchronić swoją farmę dzięki testom  
Fish Farm Solutions?

 <p><b>Patogeny wykrywane u lososi:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alfawirus łososiowatych (Salmonid alphavirus, podtypy SAV2 i SAV3) powodujący chorobę trzustki ryb łososiowatych</li> <li>• Wirus zakaźnej anemii łososi (Infectious salmon anemia virus, ISA-V)</li> <li>• Ortoreowirus rybi (Piscine orthoreovirus, PRV) wywołujący zapalenie mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych (HSMI)</li> <li>• Wirus zapalenia mięśnia sercowego (Piscine myocarditis virus, PMCV)</li> <li>• Wirus krwotocznej posocznicy (Viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV)</li> <li>• Atypowa bakteria <i>Aeromonas salmonicida</i></li> </ul> <p>Zamów testy</p>	 <p><b>Patogeny wykrywane u krewetek:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wirus zespołu białych plam (White Spot Syndrome Virus, WSSV)</li> <li>• Wirus zespołu Taura (Taura Syndrome Virus, TSV)</li> <li>• Zakaźny wirus podskórny i hematopoetyczny (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Virus, IHNV)</li> <li>• Wirus krwotocznej posocznicy (Viral haemorrhagic septicaemia virus, VHSV)</li> <li>• Bakteria <i>Vibrio parahaemolyticus</i> wywołującej ostrą martwicę wątrobotrzustki (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND)</li> </ul> <p>Zamów testy</p>	 <p><b>Patogeny wykrywane u ostryg:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Norowirus wywołujący zapalenie żołądka i jelit u ludzi (Norovirus, NoV)</li> </ul> <p>Testy w przygotowaniu</p>
--	--	---

**Rycina S62.** Asortyment marki Fish Farm Solutions (zrzut ekranu z strony <https://fishfarmsolutions.eu/> z dnia 07.06.2024 r).

#### 14.2.6. Bibliografia suplementu

- [1] Weerathunge, P.; Ramanathan, R.; Torok, V.A.; Hodgson, K.; Xu, Y.; Goodacre, R.; Behera, B.K.; Bansal, V. Ultrasensitive Colorimetric Detection of Murine Norovirus Using NanoZyme Aptasensor. *Anal. Chem.* **2019**, 5;91(5):3270-3276.
- [2] Narayan, R. Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications, I ed., Woodhead Publishing, Cambridge UK, **2016**. ISBN: 9780081000724 156-250.