

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja HAFNER

**MOLEKULARNA DOLOČITEV MALIH OKROGLIH
VIRUSOV V IZTREBKIH BOLNIKOV Z
GASTROENTERITISOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MOLECULAR DETECTION OF SMALL ROUND
STRUCTURED VIRUSES IN FAECES OF
PATIENTS WITH GASTROENTERITIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija medoddelčnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Avšič-Županc, za somentorico dr. Matejo Poljšak-Prijatelj in za recenzenta doc. dr. Miroslava Petrovca.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

Somentorica: dr. Mateja Poljšak-Prijatelj

Recenzent: doc. dr. Miroslav Petrovec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: dr. Mateja POLJŠAK-PRIJATELJ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Hafner

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7:616.34-07(043)=863
- KG Virusi/Caliciviridae/norovirusi/gastroenteritis/diagnostične metode/RT-PCR/ELISA/PCR v realnem času
- AV HAFNER, Mateja
- SA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (somentorica)/PETROVEC, Miroslav (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2007
- IN MOLEKULARNA DOLOČITEV MALIH OKROGLIH VIRUSOV V IZTREBKIH BOLNIKOV Z GASTROENTERITISOM
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 61 s., 10 preg., 13 sl., 3 pril., 88 vir.
- IJ sl,
- Jl sl/en
- AI Človeški kalicivirusi so v zadnjih letih prepoznani kot najpogostejši povzročitelji virusnega gastroenteritisa pri ljudeh. Namen naloge je bilo molekularno določiti povzročitelje virusnih gastroenteritisov, ki so bili s transmisijskim elektronskim mikroskopom zaradi nejasne morfologije diagnosticirani kot mali okrogli virusi in primerjati rezultate dobljene z encimsko imunskim testom (ELISA), s katerim smo določali antigene norovirusov ter rezultate, dobljene z molekularno metodo reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). Določili smo tudi občutljivost in specifičnost ELISA testa v primerjavi z RT-PCR metodo, ki služi kot zlati standard. Iz iztrebkov, v katerih so z elektronsko mikroskopijo določili male okrogle viruse ali kaliciviruse ter iztrebke, v katerih z elektronsko mikroskopijo niso določili virusov, so pa z ELISA testom določili norovirusne antigene skupine GGI/GGII smo osamili virusno RNA. Po osamitvi virusne RNA v vzorcih iztrebkov smo z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I pomnožili ohranjen odsek polimeraznega dela virusnega genoma. Nekaj naključno izbranim vzorcem smo pomnožili ohranjen odsek na virusnem genomu še z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in NVp110, NVp290 in NVp110 ter JV33 in SR 80 ter še z RT-PCR v realnem času. Vzorce v katerih smo določili RNA, smo nato pomnožili še z začetnimi oligonukleotidi G1SKF in G1SKR ali G2SKF in G2SKR, ki nalegajo na kapsidnem delu genoma. Pridelke pomnoževanja smo določili z gelsko elektroforezo. Z omenjenimi metodami smo ugotovili, da okužbe z norovirusi v Sloveniji večinoma povzročajo virusi genske skupine II in da se okužbe pojavljajo predvsem pri otrocih do 3 let. Ugotovili smo, da ima encimsko imunska metoda 81,3 % občutljivost in 17,1 % specifičnost, ko RT-PCR metoda predstavlja "zlati standard".

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 578.7:616.34-07(043)=863

CX Viruses/Caliciviridae/noroviruses/gastroenteritis/diagnostic methods/RT-PCR/ELISA/Real time PCR

AU HAFNER, Mateja

AA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (co-advisor)/PETROVEC, Miroslav (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2007

TI MOLECULAR DETECTION OF SMALL ROUND STRUCTURED VIRUSES IN FAECES OF PATIENTS WITH GASTROENTERITIS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 61 p., 10 tab., 13 fig., 3 ann., 88 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Human caliciviruses are among the most common cause of viral gastroenteritis in children and adults all over the world. In our study we aim to determinate agents that were diagnosed as a small round viruses by transmission electron microscope with molecular detection. We intend to compare the results of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) which was used for detection of norovirus antigens and the results of reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, we also compared the sensitivity and specificity of the ELISA test to RT-PCR that is regarded as "the gold standard". The isolation of RNA was made from the specimens which contained norovirus antigens of genogroup I or genogroup II or has been detected as caliciviruses or small round viruses when examined by electron microscopy. After the isolation of viral RNA from faeces, the part of conserved polymerase segment of viral genome was amplified with the pair of primer JV12Y and JV13I. We amplified some specimens, chosen by chance, with primer pair JV12Y and NVp110, NVp290/NVp110 and JV33 /SR 80 and also with Real time RT-PCR. The viral RNA was amplified by using the primer pair G1SKF and G1SKR or primer pair G2SKF and G2SKR, which targeted the capsid region of genome. All amplified products were determined by gel electrophoresis. Using the above mentioned methods we showed that norovirus infections in Slovenia were mostly caused by genogroup II of noroviruses and that infections were mostly found in children under 3 years. We also showed that when RT-PCR is regarded as "the gold standard", the sensitivity and the specificity of ELISA test is 81,3 % and 17,1 %, respectively.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA	3
2.2 TAKSONOMIJA IN GENETSKA RAZVRSTITEV.....	4
2.3 GENOM	7
2.4 RAZMNOŽEVANJE KALICIVIRUSOV	8
2.5 VEZAVA VIRUSOV NORWALK NA PROTEINE IZ EVKARIONTSKIH CELIC.....	9
2.6 PATOGENEZA.....	10
2.8 IMUNOST.....	11
2.9 DIAGNOSTIKA.....	12
2.9.1 Elektronska mikroskopija	12
2.9.2 Dokazovanje virusnih antigenov	13
2.9.3 Molekularne tehnike	14
2.9.4 Epidemiologija	14
3.1 MATERIALI IN METODE	16
3.1.1 Klinični material.....	16
3.1.2 Materiali in reagenti za encimsko imunski test	16
3.1.3 Materiali in reagenti za osamitev RNA s trizolom	16
3.1.4 Materiali in reagenti za osamitev RNA s komercialnim paketom Promega.....	17

3.1.5 Materiali in reagenti za osamitev RNA s komercialnim paketom Qiagen	17
3.1.6 Reagenti za reakcijo RT-PCR (Access RT-PCR System)	17
3.1.7 Reagenti za reakcijo verižne reakcije s polimerazo v realnem času	18
3.1.8 Materiali za analizo pridelka PCR z agarozno gelsko elektroforezo	18
3.1.9 Laboratorijska oprema in aparati	19
3.2 METODE DELA	20
3.2.1 Priprava kliničnih vzorcev	20
3.2.2 Encimskoimunski test	21
3.2.2.1 Izvedba encimsko imunskega testa IDEIA TM Norovirus	21
3.2.3 Osamitev RNA	22
3.2.3.1 Osamitev RNA s komercialnim kompletom	22
3.2.3.2 Osamitev RNA s komercialnim kompletom QIAGEN	23
3.2.3.3 Osamitev celokupne RNA s Trizol-om	23
3.2.4 Enostopenjska reakcija verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo	24
3.2.4.1 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline	25
3.2.4.1.1 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I	25
3.2.4.1.2 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in NVp110	26
3.2.4.1.3 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi NVp290 in NVp110	26
3.2.4.2 Pomnoževanje odseka kapsidnega dela norovirusne nukleinske kisline	27
3.2.4.2.1 Pomnoževanje odseka kapsidnega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi G1SKF in G1SKR	27
3.2.4.2.2 Pomnoževanje odseka kapsidnega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi G2SKF in G2SKR	27
3.2.4.2.3 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela sapovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi	28

3.2.5 ANALIZA PRIDELKOV PCR Z ELEKTROFOREZO V AGAROZNEM GELU	29
3.2.6 ENOSTOPENJSKA REAKCIJA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO S PREDHODNO TRANSKRIPCIO V REALNEM ČASU	29
4 REZULTATI.....	31
4.1 ZNAČILNOSTI VZORCEV	31
4.2 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA GENOMA NOROVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR.....	32
4.2.1 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I.....	32
4.2.2 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in NVp110	34
4.2.3 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi NVp110 in NVp290	35
4.3 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA GENOMA NOROVIRUSOV NA ORF2 Z RT-PCR.....	36
4.3.1 Pomnoževanje odseka genoma norovirusov genske skupine I in II.....	36
4.4 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA GENOMA SAPOVIRUSOV NA ORF1 Z RT-PCR.....	37
4.5 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA GENOMA NOROVIRUSOV Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO S PREDHODNO TRANSKRIPCIO V REALNEM ČASU	38
4.6 ZNAČILNOSTI VZORCEV	40
4.7 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST ENCIMSKO IMUNSKEGA TESTA IN POMNOŽEVANJA Z ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI JV12Y IN JV13I.....	41
5 RAZPRAVA.....	42
5.1 DOLOČANJE NOROVIRUSNIH ANTIGENOV GGI IN GGII S TESTOM ELISA.....	43
5.2 POMNOŽEVANJE TARČNIH ODSEKOV GENOMA NOROVIRUSOV Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO RT-PCR.....	44
6 SKLEPI	48
7 POVZETEK.....	49
8 VIRI	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Razdelitev človeških norovirusov (Koopmans in sod., 2002:519)	5
Preglednica 2-2: Razdelitev človeških sapovirusov (Farkas in sod., 2004:11).....	6
Preglednica 2-3: Kriptogram za nekatere noroviruse (Rockx, 2004:11).....	7
Preglednica 3-1: Nekaterne značilnosti začetnih oligonukleotidov JV12Y in JV13I	25
Preglednica 3-2: Nekaterne značilnosti začetnih oligonukleotidov JV12Y in NVP110.....	26
Preglednica 3-3: Nekaterne značilnosti začetnih oligonukleotidov NVp290 in NVp110.....	26
Preglednica 3-4: Nekaterne značilnosti začetnik oligonukleotidov G1SKF in G1SKR	27
Preglednica 3-5: Nekaterne značilnosti začetnik oligonukleotidov G2SKF in G2SKR	28
Preglednica 3-6: Nekaterne značilnosti začetnik oligonukleotidov JV33 in SR80	28
Preglednica 4-1: Specifičnost in občutljivost testa ELISA	41

KAZALO SLIK

Slika 2-1: Virus Norwalk – krioelektronska mikroskopska slika (Prasad in sod., 1999:288)	4
Slika 2-2: Genom virusov Norwalk in Sapporo (Green in sod, 2001:181).....	8
Slika 2-3: Elektronsko mikroskopski posnetek malih okroglih virusov v iztrebku bolnika (Elektronsko mikroskopski posnetek: EMD 040730).....	13
Slika 3-1: Encimsko imunski test (BioSystem Development, 2002).....	21
Slika 4-1 : Število obolelih za gastroenteritisom glede na starost.....	31
Slika 4-2: Primerjava rezultatov dokazovanja virusnih antigenov z rezultatom elektronske mikroskopije.....	32
Slika 4-3: Primerjava rezultatov dokazovanja virusnih antigenov z rezultati dokazovanja virusne RNA (začetni oligonukleotidi JV12Y/JV13I).....	33
Slika 4-4: Primerjava rezultatov testa ELISA z rezultati metode RT-PCR (začetni oligonukleotidi JV12Y/NVp110).....	35
Slika 4-5: Primerjava rezultatov testa ELISA z rezultati metode RT-PCR (začetni oligonukleotidi NVp110/NVp290).....	36
Slika 4-6: Primerjava rezultatov testa ELISA z rezultati metode RT-PCR (začetni oligonukleotidi G2SKF/G2SKR).....	37
Slika 4-7: Pomnoževanje tarčnih odsekov genoma norovirusov s štirimi pari začetnih oligonukleotidov: JV12Y /JV13I, JV12Y/NVp110, NVp110/NVp290 in G2SKF/G2SKR.....	38
Slika 4-8 : Rezultati reakcije PCR v realnem času.....	39
Slika 4-9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času.....	40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Značilnosti vzorcev uporabljenih v raziskavi

Priloga B: Značilnosti vzorcev v katerih smo določili norovirusno RNA

Priloga C: Izračun specifičnosti in občutljivosti testa ELISA

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMV	-virus ptičje mieloblastoze (ang.: Avian Myeloblastosis Virus)
bp	-bazni par
cDNA	- komplementarna DNA (ang.: complementary DNA)
Da	-dalton
ddH ₂ O	-demineralizirana destilirana voda
DNA	-deoksiribonukleinska kislina (ang.: Deoksiribonucleic Acid)
dNTP	-deoksinukleotid trifosfat
EM	-elektronska mikroskopija
ELISA	-encimsko imunski test (ang.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
GGI	-genska skupina I
GGII	-genska skupina II
MOV	-mali okrogli virusi
ORF	-odprt bralni okvir (ang.: open reading frame)
PCR	-verižna reakcija s polimerazo (ang.: Polymerase Chain Reaction)
RNA	-ribonukleinska kislina (ang.: Ribonucleic Acid)
RT	-reverzna transkripcija
<i>Tfl</i>	- <i>Thermus flavus</i>
U	-enota za encimsko aktivnost (ang.: unit)
VLP	-delci podobni virusom (ang.: Virus like particles)

1 UVOD

Gastroenteritisi so ena izmed najbolj pogostih kužnih boleznih pri otrocih in odraslih. Glavni povzročitelji virusnih gastroenteritisov so rotavirusi, astrovirusi, enterični adenovirusi ter kalicivirusi. Značilno morfolologijo kalicivirusov lahko s transmijskim elektronskim mikroskopom prepoznamo le pri majhnem odstotku okužb. Večino teh virusov lahko po morfolologiji označimo le kot male okrogle viruse (MOV). Kalicivirusi (*Caliciviridae*) so v zadnjih letih najpogostejši povzročitelji epidemij virusnega gastroenteritisa pri ljudeh (Lopman in sod., 2004). Širijo se z neposrednim stikom ali posredno z onesnaženo hrano, vodo ali vnosom iz okolja. Okužimo se fekalno-oralno ali z aerosoli (Parashar in Glass., 2003).

Kalicivirusi so ikozaedrični virusi brez ovojnice. Genom je linerna, enovijačna, pozitivno usmerjena RNA. Človeške kaliciviruse predstavljata rodova Sapovirus in Norovirus, ki se delita na genske skupine, le-te pa na genotipe (Desselberger in Gray., 2003).

V celični kulturi se ne razmnožujejo, kar otežuje diagnostiko. Kot diagnostična metoda se najpogosteje uporablja elektronska mikroskopija, v zadnjem času pa tudi encimsko imunska metoda (ELISA) za določanje virusnih antigenov. Zaradi nizke koncentracije virusov v vzorcih, je "zlati standard" za določanje virusne RNA verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) (Koopmans in sod., 2003)

1.1 NAMEN DELA

Namen naloge je bil določiti povzročitelje virusnih gastroenteritisov, ki so jih s transmijskim elektronskim mikroskopom določili kot male okrogle in primerjava rezultatov različnih metod. Primerjali smo rezultate dobljene z encimsko imunskim testom (ELISA), s katerim smo določali antigene norovirusov ter rezultate, dobljene z reakcijo RT-PCR, pri kateri smo za pomnoževanje uporabili začetne oligonukleotide, ki nalegajo na različnih področjih virusne RNA. Namen je bil tudi določiti občutljivost in specifičnost uporabljenih metod.

Diplomsko delo je bilo del projekta EVENT, SP22-CT-2004-502571, šestega okvirnega programa Evropske unije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA

Klinične znake povezane s kalicivirusnim gastroenteritisom so prvič opisali v medicinski literaturi že pred več kot 70 leti. Številne raziskave so pokazale, da velikega števila gastroenteritičnih okužb ne morejo pripisati znanim bakterijskim in parazitskim povzročiteljem (Dingle in sod., 1956). Leta 1968 je prišlo do izbruha bolezni v mestu Norwalk, pri katerem so bili poglavitni klinični znaki slabost, bruhanje in trebušni krči. Bakterijskega ali parazitskega povzročitelja niso našli, zato so sumili, da gre za virusno okužbo, vendar pa je bilo povzročitelja, zaradi nezmožnosti gojenja virusov v celični kulturi, nemogoče identificirati (Adler in Zickl, 1969). Šele leta 1972 so po dolgotrajnih prizadevanjih Kapikian in sodelavci odkrili v vzorcih iz epidemije, povzročene v osnovni šoli v mestu Norwalk, z imunsko elektronsko mikroskopijo 27 nm velike virusne delce, ki so jih poimenovali po mestu (Kapikian in sod., 1972).

Ugotovili so, da so z izbruhi povezani tudi drugi mali okrogli virusi, ki so morfološko podobni virusom Norwalk (Atmar in Estes, 2001).

Madeley in Cosgrave sta leta 1976 prvič opisala morfološko značilne kaliciviruse v iztrebkih otrok. Ker nekateri izmed njih niso kazali znakov okužbe, niso mogli sklepati na njihovo patogenost. Ko so te viruse opazovali z elektronskim mikroskopom, so na obodu imeli čašaste vdolbinice. Od tu tudi izhaja ime družine *Caliciviridae*, (lat. calyx), kar pomeni čašo oziroma kelih (Atmar in Estes, 2001). Leta 1981 je Greenberg s sodelavci predlagal, da virusi Norwalk z enojnim strukturnim proteinom z molekularno maso 30 000 Da spadajo med kaliciviruse (Greenberg in sod., 1981). Devet let kasneje so opisali značilnosti genoma virusa Norwalk in jih zaradi pozitivno usmerjene, enovijačne, poliadenilirane RNA uvrstili med kaliciviruse (Jiang in sod., 1993).

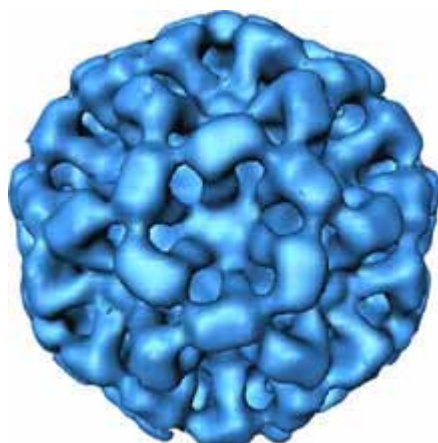
Z razumevanjem taksonomije virusov in razvojem molekularnih metod so objavili celotno nukleotidno zaporedje genoma virusov Norwalk in Southampton (Jiang in sod., 1993). Iz informacij o genomu so opisali značilnosti sapovirusov in potrdili, da so norovirusi in

sapovirusi različni, vendar sorodni virusi (Cubitt in sod., 1994; Liu in sod., 1995; Matson in sod., 1995; Numata in sod., 1997).

Ker virusov ni mogoče gojiti v celičnih kulturah, so jih največkrat dokazovali z elektronskim mikroskopom. Za dokazovanje virusnih antigenov in protiteles so razvili encimsko imunske teste. S spoznavanjem nukleotidnega zaporedja genoma virusov Norwalk in Southampton so razvili začetne oligonukleotide za pomnoževanje virusne RNA z enostopenjsko reakcijo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) (Jiang in sod., 1992a).

2.2 TAKSONOMIJA IN GENETSKA RAZVRSTITEV

Taksonomija kalicivirusov temelji na morfologiji, je pa dopolnjena s podatki, sekveniranja genoma in filogenetskimi analizami (Dingle in sod., 1995; Jiang in sod., 1993; Lambden in sod., 1993; Liu in sod., 1995). Virusi iz družine *Caliciviridae* so ikozaedrični virusi brez ovojnice, velikosti 27 do 40 nm (Atmar in Estes, 2001).



Slika 2-1: Virus Norwalk – krioelektronska mikroskopska slika (Prasad in sod., 1999:288)

Družina *Caliciviridae* se deli v štiri rodove:

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

Včasih so za poimenovanje norovirusov uporabljali ime virusi Norwalk ali mali okrogli strukturirani virusi, za sapoviruse z značilno morfologijo površine s čašastimi vdolbinami pa značilni kalicivirusi (ang. Sapporo-like viruses). Večina predstavnikov iz rodov *Norovirus* in *Sapovirus* so človeški črevesni kalicivirusi. Nekateri izmed njih povzročajo črevesne okužbe tudi pri živalih. Živalske kaliciviruse predstavljata rodova *Lagovirus* in *Vesivirus* (Caul, 1996; Chiba, 2000).

Rod *Norovirus* se glede na genetske različnosti v polimerazni in kapsidni regiji deli na vsaj dve genski skupini: GGI in GGII (Ando in sod., 2000). V gensko skupino I uvrščamo sedem genotipov, v gensko skupino II pa 8. Predlagajo še gensko skupino III z referenčnim sevom Alphanon (Koopmans in sod., 2002b). Virusi, ki pripadajo eni genski skupini imajo več kot 80% aminokislinsko podobnost v kapsidnem proteinu (Ando in sod., 2000).

Družina	Rod	Genska skupina	Genotip	Referenčni sev
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	GI	1	Norwalk
			2	Southampton
			3	Desert Shield
			4	Chiba
			5	Musgrove
			6	Hesse
			7	Winchester
		GII	1	Hawaii
			2	Melksham
			3	Toronto
			4	Bristol
			5	Hillingdon
			6	Seacroft
			7	Leeds
			8	Amsterdam
		GIII?	1	Alphatron

Rod *Sapovirus* se deli v 5 genskih skupin, znotraj katerih je 9 genotipov. Tako razdelitev so naredili na osnovi sorodstvenih razdalj in filogenetske analize 17 kapsidnih regij. Sevi iz genskih skupin I, II, IV in V so človeški kalicivirusi. Sev Cowden iz genske skupine III pa okuži prašiče (Farkas in sod., 2004).

Družina	Rod	Genska skupina	Genotip	Referenčni sev
<i>Caliciviridae</i>	<i>Sapovirus</i>	GI	1	Sapporo
			2	Parkville
			3	Stocholm
		GII	1	London
			2	Mexico
			3	Cruise ship
		GIV		Houston
		GV		Argentina

Za lažje sporazumevanje med raziskovalci so določili, da v primeru, ko je v rodu več kot ena vrsta, kriptogram vsebuje: izvorno gostiteljsko vrsto/ rod kalicivirusa/ gensko skupino kalicivirusa/ imenovanje seva / leto odkritja/ izvorno državo (Rockx, 2004).

Preglednica 2-3: Kriptogram za nekatere noroviruse (Rockx, 2004:11)

Ime virusa	Kriptogram	Oznaka dostopnega genomskega zaporedja
Norwalk virus	Hu/NV/I/Norwalk/1968/US	M87661
Mexico virus	Hu/NV/II/Mexico/1989/US	U22468
Hawaii virus	Hu/NV/II/Hawaii/1971/US	U07611

2.3 GENOM

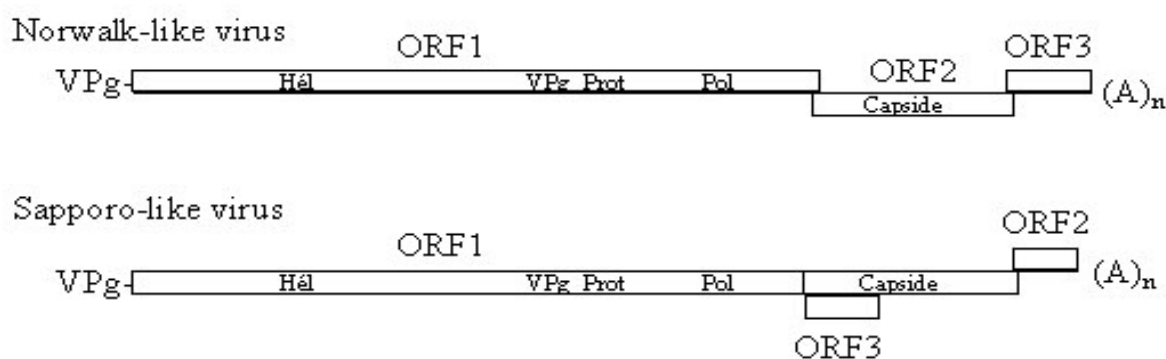
Človeški kalicivirusi imajo linearno pozitivno usmerjeno RNA. Genom je sestavljen iz treh odprtih bralnih okvirjev: ORF1, ORF2 in ORF3 (ang.: ORF – open reading frame). Dolžina genoma je od 7400 do 7800 nukleotidov. Na 5' koncu genoma virusov Norwalk se nahaja 4 nukleotide dolga nekodirajoča regija. Sledi ji ORF1, ki nosi zapis za 1738 aminokislin dolg poliprotein z molekularno maso 193,5 kDa. Ta poliprotein vsebuje kratke odseke, ki so podobni 2C (helikaza), 3C (cistein proteaza) in 3D (od RNA odvisna polimeraza) proteinom pikornavirusov (Atmar in Estes, 2001).

Med regijama ORF1 in ORF2 je 17 nukleotidov dolg odsek prekrivanja bralnih okvirjev (Clarke in sod., 1998). ORF2 kodira 530 aminokislin dolg kapsidni protein z molekularno

maso 56,6 kDa. ORF3 ki se nahaja na 3' koncu genoma, s prvim nukleotidom začetnega kodona prekriva zadnji nukleotid končnega kodona ORF2 in kodira majhen strukturni protein dolg 212 aminokislin (22,5 kDa) z visokim bazičnim nabojem (izoelektrična točka je 10,99). Funkcija proteina še ni znana, prav tako ni znanih proteinov s homologno sekvenco (Atmar in Estes, 2001). Z zadnjimi raziskovanji so odkrili, da kodira ORF3 majhen strukturni protein, ki so ga našli v praznih virusom podobnih delcih, ki so nastali s prepisom cDNA, ki je vsebovala ORF2 in ORF3 ter v virusnih delcih izoliranih iz iztrebkov (Glass in sod., 2000). Genom virusov Norwalk se zaključuje s 66 nukleotidov dolgo nekodirajočo regijo in poli-A repom na 3' koncu (Jiang in sod., 1993).

Genoma sapovirusov in norovirusov se razlikujeta glede na razporeditev bralnih okvirjev. Za predstavnika sapovirusov, virus Manchester je značilno, da ORF1 regija kodira nestrukturni protein kot tudi kapsidni protein, ki se nahaja na koncu nestrukturnega proteina (Liu in sod., 1995,1997). Zaradi takega zapisa je ORF1 norovirusa daljši od ORF1 sapovirusov. Tako organiziran genom je tudi pri povzročitelju zajčje hemoragične bolezni, ki pripada rodu *Lagovirus* (Meyers in sod., 1991).

ORF2 kodira majhen visoko bazičen protein z neznano funkcijo, podoben ORF3 pri norovirusih. Genom virusa Manchester ima tudi ORF3, ki znotraj kapsidnega proteina kodira še majhen bazičen protein (Liu in sod., 1995).



Slika 2-2: Genom virusov Norwalk in Sapporo (Green in sod, 2001:181)

2.4 RAZMNOŽEVANJE KALICIVIRUSOV

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

Enovijačna, pozitivno usmerjena RNA se pomnožuje z encimom od RNA odvisne polimeraze RNA. Najprej se sintetizira genomu komplementarna negativno usmerjena RNA, ki je matrica za strnitev novih molekul pozitivno usmerjene RNA. Na posamezni negativno usmerjeni RNA se sočasno sintetizira več pozitivno usmerjenih RNA. Opisani kompleks molekul RNA imenujemo replikativni intermediat. Pozitivno usmerjena RNA je hkrati tudi mRNA, ki se prevede v beljakovine. Ker njihova RNA deluje kot mRNA, ti virusi ne potrebujejo transkriptaze (Koren in Marin, 1998).

2.5 VEZAVA VIRUSOV NORWALK NA PROTEINE IZ EVKARIONTSKIH CELIC

Za proučevanje vezave virusov Norwalk na proteine iz evkarionskih celic so raziskovalci izbrali dve celični kulturi in sicer trajne epiteljske celice človeškega karcinoma vratu maternice – celice HeLa in trajne epiteljske celice človeškega črevesnega adenokarcinoma – celice CaCO-2. Celice HeLa vsebujejo proteine in dejavnike, ki so potrebni za njihovo prevajanje v celičnih kulturah. Celice CaCO-2 so podobne človeškim enterocitom tankega črevesja, kjer se virusi Norwalk razmnožujejo. Rekombinantni delci, ki so morfološko in antigensko podobni naravnim virusom Norwalk, se vežejo in celo prodrejo v celice CaCO-2. Ugotovili so, da se začetnih 110 nukleotidov na 5' koncu genoma virusov Norwalk specifično vežejo na različne proteine v celicah HeLa. Ker imajo ti proteini pomembno vlogo pri translaciji pikornavirusov sklepajo, da imajo pomembno vlogo tudi pri translaciji in/ali replikaciji norovirusov (Gutierrez-Escolano in sod., 2000).

Proteini (PABP) iz celic HeLa se vežejo tudi s poliadenilirano regijo na 3' koncu genoma virusov Norwalk, kjer se na zadnjih 47 nukleotidih tvorijo stabilne zanke (Gutierrez-Escolano in sod., 2003).

2.6 PATOGENEZA

Pri ljudeh pride do okužbe po oralni poti. Ko virusi, odporni na kislino, prehajajo skozi želodec, se začnejo razmnoževati v tankem črevesu (Caul, 1996). Največ podatkov o sami patogenezi človeških kalicivirusov so zbrali v študijah narejenih na prostovoljcih v ZDA. Posameznikom so odvzeli biopsijski material iz črevesja pred in po okužbi. Preiskave s svetlobnim in elektronskim mikroskopom so pokazale, da so posamezniki s kliničnimi znaki imeli lezije na črevesni sluznici. Površina sluznice se je vnela in absorpcijske epitelne celice so se morfološko spremenile. Mikroskopsko so odkrili tudi skrajšanje mikrovilov, razširjanje endoplazemskega retikuluma, nabrekle mitohondrije ter znotrajcelične edeme. Po dveh tednih je tanko črevo dobilo normalen histološki videz. (Agus in sod., 1973; Dolin in sod., 1975; Schreiber in sod., 1973, 1974).

Norovirusi povzročajo okužbe pri ljudeh vseh starosti, medtem ko sapovirusi okužijo predvsem otroke (Schreiber in sod., 1973, 1974).

V kliničnih študijah so opazili, da je v črevesju zmanjšana aktivnost encimov: trehalaz, alkalne fosfataze, saharaze (Kapikian in sod. 1996, Estes in sod., 1997). Pride tudi do trenutnega zmanjšanja absorpcije maščob in laktoze. Aktivnost adenilat ciklaze v jejunu se ne poveča (Agus in sod., 1996 Estes in sod., 1997). Izločanje HCl, pepsina in drugih faktorjev se po vnosu norovirusov v želodcu ni spremenilo (Meeroff in sod., 1980). Predlagali so, da je nenormalno delovanje želodčnih funkcij vzrok za slabost in bruhanje pri gastroenteritistih povzročenih s kalicivirusi. V prostovoljcih okuženih z virusi Norwalk niso določili interferonov v serumu, aspiratu in biopsiji jejunna (Dolin in sod., 1975).

2.7 KLINIČNA SLIKA

Človeški kalicivirusi povzročajo pri ljudeh akutni gastroenteritis. Prvi klinični znaki se običajno pokažejo po 24-28 urah po okužbi. Znaki okužbe z norovirusi in sapovirusi niso hudi in navadno okužba sama izzveni. Trajanje bolezni je 12-60 ur (Adler in Zickl, 1969;

Kaplan in sod., 1982a). Pri odraslih je značilno pogosto bruhanje v loku, po čemer okužbo ločimo od drugih gastroenteritičnih okužb z bakterijami kot so *Salmonella*, *Shigella*, *S. aureus* (Adler in Zickl, 1969; Kaplan in sod., 1982a).

Dejstvo je, da prepoznavanje izbruhov norovirusov temelji na kliničnih znakih in epidemioloških značilnostih (Kaplan in sod., 1982).

Infektivna doza je 10-100 virusnih delcev (Caul, 1994). Stopnja obolevnosti znaša 45% ali celo več. Virusi se pričnejo izločati z iztrebki in izbljuvki že v inkubacijski dobi in se lahko izločajo do 10 dni po okužbi ali celo dlje časa (Kaplan in sod., 1982, Kapikian in sod 1996, Graham in sod 1994, Greenberg in sod. 1979). V začetnem obdobju bolezni se lahko izločajo celo v količini 10^8 virusnih delcev na gram iztrebka. V 30 % primerov oboleli izločajo viruse do tri tedne po okužbi (Koopmans in Duizer, 2004).

2.8 IMUNOST

O imunosti na norovirusne okužbe je malo znanega. V raziskavah, kjer so prostovoljce okužili, so ugotovili, da okužene osebe lahko razvijejo kratkotrajno imunost, vendar le za ponovne okužbe z virusi sorodnega genotipa, ki so ga uporabili za primarno okužbo (Noel in sod., 1997; Jiang in sod., 1999).

Pri nekaterih študijah, kjer so prostovoljce okužili s črevesnimi filtrati, so našli lezije na črevesni sluznici, kljub temu, da niso kazali znakov okužb (Schreiber in sod., 1973, 1974). Nekateri izmed prostovoljcev niso kazali nikakršnih znakov okužbe. Ko so te prostovoljce ponovno okužili z istim genotipom seva, so nekateri izmed njih razvili znake okužbe, medtem ko jih drugi niso (Parrino in sod., 1977; Wyatt in sod., 1974). Na osnovi te raziskave so sklepali, da je možen razvoj kratkotrajne imunosti vsaj pri nekaterih posameznikih. Prav tako so na prostovoljcih izvedli študijo o pojavu dolgotrajne imunosti. Ugotovili so, da se dolgotrajna imunost na kaliciviruse ne pojavi. Tako kot pri drugih raziskavah so prostovoljce, ki niso kazali znakov okužb ponovno izpostavili povzročiteljem in tudi drugič niso kazali znakov okužb. Tega niso mogli pripisati začetnemu nivoju kroženja protiteles (Parrino in sodelavci, 1977). Najverjetneje je do

razlik, da so nekateri razvili z norovirusi povezan gastroenteritis in drugi ne, prišlo zaradi lokalnega imunskega odziva črevesne sluznice ali zaradi genetskih lastnosti (specifičen receptor) (Lopman in sod., 2002).

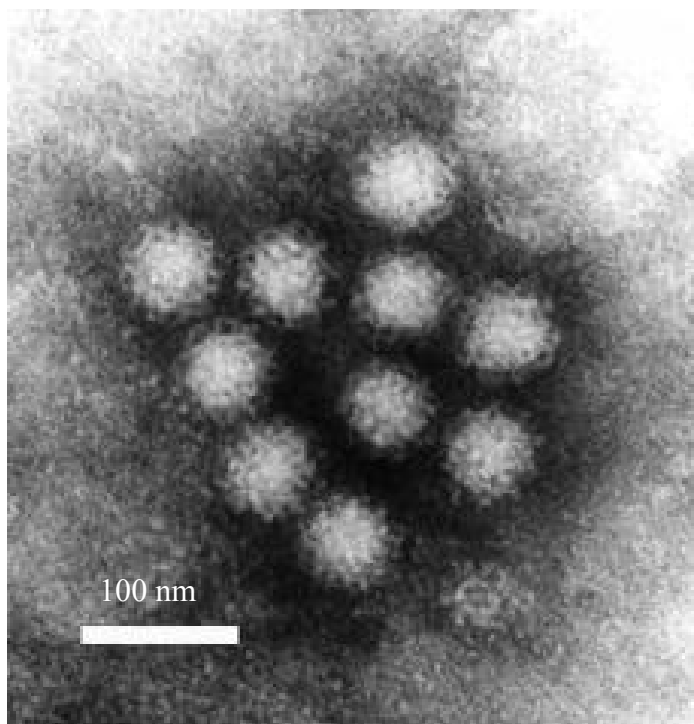
Nasprotno od rotavirusov je pri norovirusih moč opaziti visoko pojavnost in obolevnost pri zdravih odraslih osebah, tudi če je bila večina okužena že v otroštvu (Lopman in sod., 2002).

2.9 DIAGNOSTIKA

2.9.1 Elektronska mikroskopija

Ker človeških kalicivirusov ni možno gojiti v celičnih kulturah, predstavlja elektronska mikroskopija temeljno diagnostično metodo. Dokazovanje norovirusov v iztrebkih je zahtevno saj nimajo vedno značilne morfološke zgradbe. Zato lahko detekcijo izvaja le dobro usposobljeno osebje. (Caul in Appleton, 1982). Vzorce za elektronsko mikroskopijo pripravijo s tehniko negativnega kontrastiranja. Metoda je dokaj neobčuljiva, saj je potrebna visoka koncentracija virusnih delcev - 10^6 virusnih delcev na ml iztrebka (Doane, 1994). Detekcija kalicivirusov je mogoča le še do 48 ur po prenehanju bolezenskih znakov (Caul in Appleton, 1982).

Pri imunski elektronski mikroskopiji viruse prikažemo po reakciji s protitelesi, pridobljenimi v konvalescentni fazi bolezni iz seruma okuženih posameznikov z gastroenteritisom (Atmar in Estes, 2001). Protitelesa in antigeni tvorijo imunske komplekse, ki jih negativno kontrastiramo (Doane, 1994). Metode imunske elektronske mikroskopije je Kapikian s sodelavci uporabil pri svojem odkritju virusnega povzročitelja v mestu Norwalk (Kapikian in sod., 1972) in od takrat metodo uporabljajo za določitev drugih človeških kalicivirusov (Thornhill in sod., 1977; Dolin in sod., 1982; Vial in sod., 1990).



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

2.9.2 Dokazovanje virusnih antigenov

Za pridobivanje velikih količin virusnih delcev so zasnovali ekspresijski sistem bakulovirusov (Jiang in sod., 1992b). Tako pridobljeni delci so morfološko in antigensko podobni kapsidnim proteinom virusa Norwalk (Green in sod., 1993). Po izpostavitvi živali rekombinantno pridobljenemu proteinu virusa Norwalk, so pridobili hiperimunski serum, ki ga uporabljajo pri dokazovanju antigenov (Jiang in sod., 1992b). Rekombinantni antigeni, monoklonska protitelesa in encimsko imunski testi so bili od takrat naprej narejeni še za številne druge noroviruse poimenovane po mestu, kjer so jih določili (*Mexico, Snow Mountain, Hawaii, Desert Shield, Toronto, Grimsby, Sapporo, Southampton* in *Lordsdale*). Danes ti virusi predstavljajo določene genotipe norovirusov. (Hardy in sod., 1996; Herrmann in sod., 1995; Atmar in Estes, 2001). Čeprav so encimsko imunski testi visoko občutljivi v primerjavi z ostalimi testi, jih v diagnostičnih laboratorijih zaradi njihove nizke specifičnosti omejeno uporabljajo (Jiang in sod., 2000).

2.9.3 Molekularne tehnike

Prvič so RNA virusov Norwalk pomnožili z verižno polimerazno reakcijo s predhodno reverzno transkripcijo leta 1992 (Jiang in De Leon in sodelavci, 1992). Od takrat je to pogosta diagnostična in raziskovalna metoda. Popolno sekveniranje genoma različnih človeških kalicivirusov (Jiang in sod., 1993; Lambden in sod., 1993; Dingle in sod., 1995) je vodilo do razvoja različnih začetnih oligonukleotidov. V primerjavi z elektronsko mikroskopijo je RT-PCR veliko občutljivejša diagnostična metoda, s katero lahko dokažemo RNA virusov še dva tedna po okužbi ali pa še dlje (Parashar in sod., 1998; Yamazaki in sod., 1996). Zaradi genetske raznolikosti znotraj družine *Caliciviridae* je bilo težko najti občutljive in specifične začetne oligonukleotide, s katerimi bi določili vse noroviruse. Narejenih je bilo veliko začetnih oligonukleotidov za najbolj ohranjeno regijo genoma – polimerazni gen, prav tako tudi za kapsidno in helikazno regijo (De Leon in sod., 1992; Yamazaki, 1996; Green in sod., 2000; Vinje in sod., 2000;). Analiza več kot ene regije je lahko pomembna pri določanju edinstvene ali rekombinantne vrste (Vinje in sod., 2000).

2.9.4 Epidemiologija

Norovirusi povzročajo okužbe pri ljudeh vseh starosti in so za rotavirusi, drugi najpogostejši vzrok gastroenteritisa pri majhnih otrocih. Sapovirusi povzročajo okužbe predvsem pri dojenčkih in otrocih (Kapikian in sod., 1996; Pang in sod., 2000).

Človeški kalicivirusi se širijo med ljudmi z neposrednim stikom ali posredno s kontaminirano vodo, hrano ali vnosom iz okolja. Pot okužbe je običajno fekalno oralna ali z aerosoli, ki se sproščajo pri bruhanju (Pether in Caul, 1983; Koopmans in Duizer, 2004). Veliko norovirusnih epidemij je povzročila z norovirusi kontaminirana hrana. Vzrok so najpogosteje okuženi prenašalci hrane, školjke, sadje in zelenjava, ki se kontaminira med pripravljanjem. Pogosti so tudi prenosi virusov s kontaminirano vodo, tako pri pitju kot pri plavanju (Lopman, 2002; Koopmans in Duizer, 2004).

V preteklosti za večino izbruhov ni bilo možnosti potrditve okužbe v laboratoriju. Tudi po odkritju virusa Norwalk je zaradi relativno neobčutljive metode odkrivanja virusov z elektronskim mikroskopom veliko vzrokov za izbruhe ostalo nerazjasnenih (Kapikian in sod., 1972, Kapikian in sod., 1982a). Zaradi neustreznih vzorcev ali pa zato, ker primerne občutljive diagnostične metode, kot so imunske in molekularne, niso razpoložljive izven referenčnih laboratorijev, veliko izbruhov ostane nepotrjenih. Kadar ni laboratorijske potrditve povzročitelja okužbe lahko včasih določimo na osnovi epidemioloških sledi o izbruhu. Da je izbruh povzročil virus pomislimo v primeru, ko ustreza naslednjim zahtevam

- v vzorcih iz črevesja ne odkrijejo patogenih bakterij
- povprečni inkubacijski čas je 24-48 h
- znaki okužbe trajajo 12-60 h
- bljuvanje pri vsaj polovici okuženih oseb

(Kaplan in sod., 1982).

Kasneje so dodali še dodatni kriterij, da mora biti bljuvanje pogosto in povezano s povišano telesno temperaturo (Hedberg in Osterholm, 1993). S tako metodo ne moremo določiti virusnega povzročitelja (*Sapovirus*, *Norovirus*), ampak je uporabna kot eno izmed orodij v javnem zdravstvu za ugotavljanje bremena virusnega gastroenteritisa.

3.1 MATERIALI IN METODE

3.1.1 Klinični material

V raziskavo smo vključili 102 vzorca iztrebkov bolnikov z virusnim gastroenteritisom, ki so jih v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani dobili za rutinsko diagnostiko v obdobju od 09.07.2006 do 7.10.2006. Vzorci so bili do obdelave shranjeni v fosfatnem pufru pri -20 °C.

3.1.2 Materiali in reagenti za encimski imunski test (DAKO kataloška št. K6044)

- Mikrotitrna ploščica z vezanimi specifičnimi antigeni za gensko skupino I in gensko skupino II norovirusov
- Negativna kontrola
- Pozitivna kontrola
- Konjugat za gensko skupino I in gensko skupino II
- Spiralni pufer (25x)

Pripravimo ga z redčenjem 25x spiralnega pufra, tako da 1 delu spiralnega pufra dodamo 24 delov ddH₂O

- Substrat TMB (tetrametilbenzidin)
- Raztopina za ustavitev reakcije

3.1.3 Materiali in reagenti za osamitev RNA s trizolom

- Trizol™ (Invitrogen)
- Kloroform (Merck)
- 2-propanol (Merck)
- 75% etanol, pripravljen iz absolutnega etanola (Merck)

- demineralizirana in destilirana (ddH₂O) sterilna voda brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- 1,5 ml epruvete PLG (ang.: Phase Lock Gel, Eppendorf)

3.1.4 Materiali in reagenti za osamitev RNA s komercialnim paketom Promega (SV Total RNA Isolation System, Promega)

- SV RNA lizirajoči pufer z dodanim β -merkaptetanolom
- SV RNA razredčitveni pufer
- 95% etanol
- SV RNA spiralna tekočina
- Dna-zna inkubacijska mešanica:
 - Yellow core pufer
 - MnCl₂
 - DnazaI
- Raztopina za ustavitev reakcije z etanolom
- demineralizirana in destilirana (ddH₂O) sterilna voda brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)

3.1.5 Materiali in reagenti za osamitev RNA s komercialnim paketom Qiagen

- AVL pufer
- etanol (96%-100%)
- AW1 pufer
- AW2 pufer
- AVE pufer
- QIAamp Mini Spin kolone

3.1.6 Reagenti za reakcijo RT-PCR (Access RT-PCR System)

- ddH₂O – voda brez ribonukleazna aktivnosti (Promega)

- 5x AMV/Tfl reakcijski pufer (Promega)
- MgSO₄, konc. 10 mM (Promega)
- Začetni oligonukleotidi:
 - JV12Y in JV13I za pomnoževanja polimeraznega odseka na ORF1 norovirusov
 - JV12Y in NVp110 za pomnoževanje polimeraznega odseka na ORF1 norovirusov
 - NVp110 in NVp290 za pomnoževanje polimeraznega odseka na ORF1 noro- in sapovirusov
 - G1SKF in G1SKR za pomnoževanje kapsidnega odseka na ORF2 norovirusov genske skupine I (GGI)
 - G2SKF in G2SKR za pomnoževanje kapsidnega odseka na ORF2 norovirusov genske skupine II
 - SR80 in JV33 za pomnoževanje polimeraznega odseka na ORF1 sapovirusov

Vse začetne oligonukleotide smo dobili v liofilizirani obliki z znano maso

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

3.1.7 Reagenti za reakcijo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (Norovirus, Cepheid)

- ddH₂O
- analitski specifični reagent norovirusnih začetnih oligonukleotidov
- enostopenjski RT-PCR pufer (Qiagen)
- enostopenjski RT-PCR dNTP mix (Qiagen)
- enostopenjska RT-PCR encimska mešanica (Qiagen)
- MgCl₂ (50mM)

3.1.8 Materiali za analizo pridelka PCR z agarozno gelsko elektroforezo

- agaroz (Promega)
- 1x TAE puferska raztopina

Pripravimo jo z redčenjem 50X TAE puferske raztopine. Za pripravo 50x TAE puferske raztopine potrebujemo:

- Tris baza 242,0 g
- Ocetna kislina 57,0 g
- EDTA 37,2 g

Tris bazo in EDTA dodamo v destilirano vodo do skupnega volumna 850 ml. Raztopimo reagente in dodamo očetno kislino, pH vrednost uravnamo na 8,5 ter dodamo vodo do 1000 ml.

- Etidijev bromid

Pripravimo ga v koncentraciji 50 mg/ml:

- Etidijev bromid 500 mg
- Voda 10 ml

Iz te koncentracije pripravljamo delovno raztopino s koncentracijo 5 mg/ml z 10x redčenjem izhodne raztopine v 1x puferski raztopini TAE.

- 6x nanašalni pufer
- Nanašalno barvilo
- Označevalec molekularne mase DNA

Uporabljali smo označevalce molekularne mase DNA 100bp (Promega)

3.1.9 Laboratorijska oprema in aparati

- komori za varno delo (Iskra PIO in LFV 9)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 541R)
- mešalo vorteks (Tehtnica Železniki)
- stojalo za epruvete (Eppendorf)
- plastične epruvete različnih velikosti (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml Eppendorf)
- avtomatske pipete Eppendorf z območji pipetiranja 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l
- nastavki s filtri za avtomatske pipete (Neptun)
- spektrofotometer (Tecan)

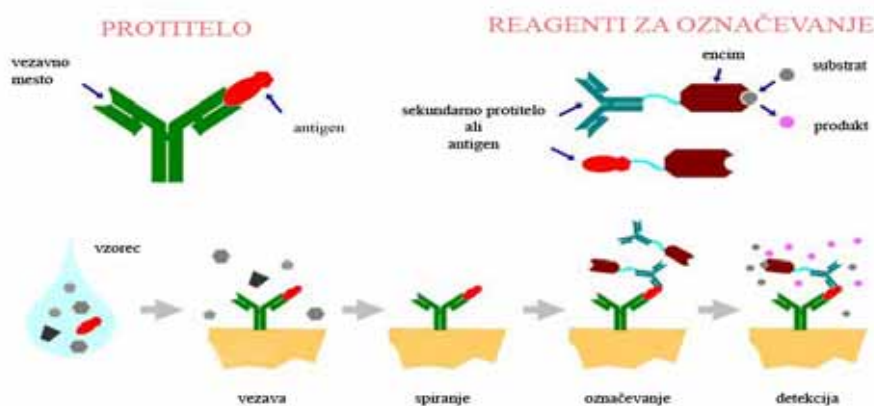
- računalniški program za merjenje optične gostote (Magellan)
- termopomnoževalnik (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400)
- tehtnica (Sartorius)
- mikrovalovna pečica (MWG 729, Clatronic)
- napajalnik za elektroforezo (LKB Bromma)
- kadička za elektroforezo (Biometra)
- UV transiluminator (LKB)
- kamera za snemanje agaroznih gelov (BIO-RAD GEL doc 2000)
- računalniški program (Quantity one, BIO-RAD)
- merilni valj
- erlenmajerice
- staničevina
- zaščitne rokavice brez smukca (Safeskin)
- nitrilne zaščitne rokavice (Safeskin)

3.2 METODE DE LA

3.2.1 Priprava kliničnih vzorcev

V puferski raztopini smo suspendirali približno 1g iztrebkov, centrifugirali 5 minut pri 1600 g in supernatant shranili pri +4 °C ali -20 °C do nadaljne obdelave.

3.2.2 Encimskoimunski test (ang. Enzyme linked immunosorbent assay)



Slika 3-1: Encimsko imunski test (BioSystem Development, 2002)

3.2.2.1 Izvedba encimsko imunskega testa IDEIATM Norovirus (Dako Cytomation)

Encimsko imunsko metoda je običajno visoko občutljiva, saj lahko določimo manj kot 1 ng virusnega antigena v 1 ml kužnine (Koren in Marin, 2002).

IDEIATM Norovirus je kvalitativni test za dokazovanje in razlikovanje genske skupine I (GGI) in genske skupine II (GGII) norovirusov. Test deluje na principu sendvič metode. Vsebuje kombinacijo monoklonskih in poliklonskih protiteles specifičnih za gensko skupino I (GGI) in II (GGII).

Uporabili so mikrotitracijsko ploščico za določanje norovirusov GGI in GGII. Specifična monoklonska protitelesa, usmerjena proti antigenom GGI in GGII, so vezana v vdolbinicah na mikrotitracijski ploščici. V vsako vdolbino so nanесли po 100 μ l raztopine iztrebkov v pufru. Po dve vdolbinici na vsaki mikrotitracijski ploščici so uporabili za pozitivno in negativno kontrolo. Dodali so 100 μ l konjugata, ki vsebuje za GGI in GGII specifična kunčja poliklonska protitelesa, označena z encimom hrenovo peroksidazo in inkubirali 1h pri sobni temperaturi. Antigen norovirusov v vzorcu se ujame med protitelo, vezano na trden nosilec in protitelo, označeno z encimom. Po inkubaciji so vdolbinice na mikrotitracijskih ploščicah 5X sprali s 350 μ l spiralne tekočine. Tako so odstranili presežek vzorca in nevezana protitelesa. Nato so dodali 100 μ l substrata TMB ter inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Specifična protitelesa, vezana z encimom, so

zaznali po spremembi barve substrata v modro. Kjer specifičnih protitelov ni, se barva ne spremeni. Po inkubacijskem času so dodali še raztopino za ustavitev reakcije, ki vsebuje žveplovo kislino in barva se je iz modre spremenila v rumeno. Intenziteta barve kaže, da so norovirusni antigeni GGI ali GGII navzoči. Optično gostoto so izmerili s spektrofotometrom pri 450 nm.

3.2.3 Osamitev RNA

3.2.3.1 Osamitev RNA s komercialnim kompletom (SV Total RNA Isolation System, Promega)

Čiščenje s centrifugiranjem: v avtoklavirno epico smo odpipetirali 146 μ l lizirajočega pufra (SV RNA Lysis Buffer) z dodatkom β -merkaptetoanola. Dodali smo 250 μ l vzorca ter 350 μ l dilucijskega pufra (SV RNA Dilution Buffer) ter premešali z rahlim obračanjem. Lizat smo segrevali 3 minute pri 70 °C v vodni kopeli. Nato smo centrifugirali 10 min pri 14000x g. Supernatant smo previdno odpipetirali v novo epico, dodali 200 μ l 95 % etanola shranjenega na 4 °C in premešali s pipetiranjem. Tekočino smo prenesli v kolono za centrifugiranje in centrifugirali 1 min pri 14000x g. Eluat smo zavrgli. Dodali smo 600 μ l spiralne tekočine z etanolom (SV RNA Wash Solution), centrifugirali 1 minuto pri 14000x g, eluat smo zavrgli. Pripravili smo Dna-zno inkubacijsko mešanico:

- 40 μ l Yellow core buffer
- 5 μ l 0.09M MnCl₂
- 5 μ l DnazaI (-20 °C)

Dobro smo premešali s pipetiranjem. Dodali smo 50 μ l Dna-zne mešanice na membrano ter inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Nato smo dodali 200 μ l raztopine za zaustavitev reakcije z etanolom (ang.: Dna-se stop solution), centrifugirali 1 minuto pri 14000x g. Po končanem centrifugiranju smo dodali 600 μ l SV RNA spiralne tekočine, centrifugirali 1 minuto pri 14000x g. Spraznili smo zbiralno epico, dodali 250 μ l SV RNA spiralne tekočine in centrifugirali 2 minuti pri 14000x g. Iz zbiralne epice smo prenesli košarico na elucijsko epico. Dodali smo 30 μ l vode proste nukleaz na membrano, centrifugirali 1 minuto pri 14000x g. Eluirano RNA smo shranili na -70°C.

3.2.3.2 Osamitev RNA s komercialnim kompletom QIAGEN

V 1.5 ml avtoklavirne epice smo odpipetirali 560 µl AVL pufra, ki vsebuje nosilec RNA. V vsako epico smo dodali 140 µl vzorca iztrebka in vorteksirali 15 sekund. Inkubirali smo 10 minut na sobni temperaturi. Kratko smo centrifugirali, da smo odstarnili kapljice iz sten epic. Dodali smo 560 µl etanola (96 %-100 %) in vorteksirali 15 sekund ter kratko centrifugirali. 630 µl raztopine smo prenesli v kolono za centrifugiranje (QIAamp Mini spin column), pokrili s pokrovčkom in centrifugirali 1 minuto pri 8000x g. Kolono smo prenesli v čisto 2 ml zbiralno epico in zavrgli epico s filtratom. Previdno smo odprli kolono in še enkrat dodali 630 µl raztopine v kolono ter centrifugirali. Po končanem centrifugiranju smo dodali 500 µl pufra AW1, pokrili kolono, centrifugirali 1 minuto pri 8000x g. Kolono smo prenesli v čisto 2 ml zbiralno epico in zavrgli epico, ki je vsebovala filtrat. Previdno smo odprli kolono in dodali 500 µl pufra AW2 ter centrifugirali 3 min pri 14000x g. Kolono smo prenesli v čisto 2 ml epico in centrifugirali 1 min pri 14000x g. Kolono smo prenesli v 1,5 ml epico in dodali 60 µl AVE pufra, pokrili in inkubirali 1 min na sobni temperaturi ter centrifugirali 1 min pri 8000x g. RNA smo shranili na -70 °C.

3.2.3.3 Osamitev celokupne RNA s Trizol-om

Izolacijo smo opravili v komori za sterilno delo. Za pipetiranje smo uporabljali nastavke s filtri ter materiale in opremo brez ribonukleazne aktivnosti. Med izolacijo je bilo pomembno pogosto menjavanje rokavic. Centrifugiranje je potekalo pri temperaturi 4 °C. Vzorce shranjene na -20 °C je bilo potrebno najprej odmrzniti pri sobni temperaturi ter premešati na mešalu.

RNA smo osamili s Trizolom. Predhodno smo pripravili epico s PLG (phase lock gel) ter jo kratko centrifugirali (30 s na 1400x g), da se je gel vsedel na dno epice. V novi 1,5 ml epici smo zmešali 250 µl vzorca ter 750 µl Trizola (-20 °C). Dobro smo suspendirali s pipetiranjem. Sledila je 5-minutna inkubacija na sobni temperaturi. Dodali smo 200 µl kloroforma (CHCl₃), dobro zaprli ter premešali na mešalu. Vsebino smo prenesli v epico s PLG. Sledila je ponovna inkubacija na sobni temperaturi 5-10 minut. Po inkubaciji smo

centrifugirali 5 min na 14000x g. S PLG se je tvorila meja med vodno in organsko fazo. V zgornji vodni fazi se je nahajala RNA, v organski fazi pa so bili proteini ter druge nečistoče. Vodno fazo smo previdno prenesli v novo 1,5 ml epico in dodali 500 μ l izopropanol, ki je bil ohlajen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter dobro premešali. Inkubirali smo 10 minut na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo centrifugirali 10 minut pri 13200x g. Nato smo odlili supernatant, RNA smo sprali z 0,5 ml 75 % etanola ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Premešali smo na mešalu ter centrifugirali 5 minut pri 10000x g. Odlili smo supernatant in RNA sušili na zraku v sterilni komori pri maksimalnem pretoku zraka približno 30 minut. Na koncu smo RNA raztopili v 30 μ l destilirane, deamineralizirane, sterilne vode brez ribonuklezane aktivnosti. Raztopljeno RNA smo shranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ker raztopljena v vodi ni stabilna.

3.2.4 Enostopenjska reakcija verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo

Uporabili smo komercialni komplet Access RT-PCR System proizvajalca Promega. Osamljeno RNA smo z encimom reverzna transkriptaza najprej prepisali v komplementarno DNA. Uporabili smo reverzno transkriptazo, osamljeno iz virusa ptičje mieloblastoze (AMV; ang.: Avian Mieloblastosis Virus).

Reakcija je bila enostopenjska, ker reverzni prepis in pomnoževanje potekata v eni epruveti. V označeno 0,2 ml epruvetko smo odpipetirali 1 μ l reverznega začetnega oligonukleotida s koncentracijo 50 pmol/ μ l in 5 μ l 10 x redčenega vzorca RNA v ddH₂O. Vzorec za pozitivno kontrolo smo predhodno potrdili s sekveniranjem. V epruvetko z negativno kontrolo smo dali namesto vzorca 5 μ l ddH₂O. Epruvetke smo dali v termopomnoževalnik in nastavili program za denaturacijo (5 min, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po končani denaturaciji se je temperatura znižala na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med časom denaturacije smo pripravili reakcijsko mešanico za določeno število vzorcev. Mešanica za 1 vzorec je vsebovala:

- 28 μ l ddH₂O
- 10 μ l 5xAMV/Tfl pufra
- 2 μ l 25mM MgSO₄
- 1 μ l 10mM dNTP mix

- 1 µl začetnega oligonuklotida s koncentracijo 50 pmol/µl
- 1 µl encima AMV reverzne transkriptaze (5 U/µl)
- 1 µl encima Tfl DNA polimeraze (5 U/µl)

44 µl mešanice smo dodali denaturirani RNA tako da je bil končni volumen 50 µl. Nastavili smo program za potek verižne reakcije s polimerazo. Pri 42 °C 45 minut je potekal reverzni prepis RNA v komplementarno DNA. Sledilo je 2-minutno segrevanje pri 94 °C, kar je omogočilo inaktivacijo reverzne transkriptaze in razgradnjo RNA-cDNA dvojnovičajnic. Nato je potekalo 40 temperaturnih ciklov:

- 30 sekund pri 94 °C – denaturacija cDNA
- 1 minuta pri 37 °C ali 45 °C ali 48 °C - prileganje začetnih oligonukleotidov
- 2 minuti pri 68 °C – podaljševanje začetnih oligonukleotidov

Cikel se je zaključil s 7 minutnim končnim podaljševanjem pri 68 °C in ohlajanjem reakcijske mešanice na 4 °C.

3.2.4.1 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline

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

Izbrali smo začetne nukleotide, ki so za človeške noroviruse skupinsko značilni in pomnožujejo 326 bp dolg ohranjen odsek gena za od RNA odvisno polimerazo RNA na ORF1 (Preglednica 3-1) (Vennema in sod., 2002:234)

Preglednica 3-1: Nekatere značilnosti začetnih oligonukleotidov JV12Y in JV13I

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Mesto prileganja
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	*4552 - 4572

JV13I	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878*
-------	-----------------------	--------------

Y – C/T

I – inozin (dovoljuje parjenje z vsemi štirimi bazami)

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37°C.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili RNA iz vzorcev 98/06, 782/06, 2084/06, 2243/06, kjer smo norovirusno RNA potrdili s sekveniranjem.

3.2.4.1.2 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in NVp110

Preglednica 3-2: Nekatere značilnosti začetnih oligonukleotidov JV12Y in NVP110

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Mesto prileganja
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	*4552 - 4572
NVp110	AC(A/T/G)AT(C/T)TCATCATCACCATA	4865-4884*

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37 °C.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili RNA vzorca 2084/06.

Pomnožen pridelek je bil velik 332 bp.

3.2.4.1.3 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi NVp290 in NVp110

Začetni oligonukleotidi Nvp290 in NVp110 prav tako nalegajo na polimerazni regiji genoma norovirusov, vendar z nekaj baznih parov zamika v primerjavi z JV12Y in JV13I (Le Guyader in sod.,1996; Jiang in sod., 1999).

Preglednica 3-3: Nekatere značilnosti začetnih oligonukleotidov NVp290 in NVp110

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Mesto prileganja
-------------------------	-------------------------------	------------------

NVp290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	*4568-4591
NVp110	AC(A/T/G)AT(C/T)TCATCATCACCATA	4865-4884*

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37 °C.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili RNA vzorca 782/06.

Pomnožen pridelek je bil velik 316 bp (Preglednica 3-3).

3.2.4.2 Pomnoževanje odseka kapsidnega dela norovirusne nukleinske kisline

3.2.4.2.1 Pomnoževanje odseka kapsidnega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi G1SKF in G1SKR

GGI smo določili z začetnimi oligonukleotidi (Preglednica 3-4):

- G1SKF
- G1SKR

Preglednica 3-4: Nekaterne značilnosti začetnih oligonukleotidov G1SKF in G1SKR

(Kojima in sod., 2002:109)

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Mesto prileganja
G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	*5342-5361
G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	5653-5671*

Y-C/T

R-A/G

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 45 °C.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili RNA vzorca 2003/06.

Pomnožen pridelek je bil velik 329 bp.

3.2.4.2.2 Pomnoževanje odseka kapsidnega dela norovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi G2SKF in G2SKR

GGII smo določili z začetnimi oligonukleotidi (Preglednica 3-5):

- G2SKF
- G2SKR

Preglednica 3-5: Nekatere značilnosti začetnih oligonukleotidov G2SKF in G2SKR

(Kojima in sod., 2002:109)

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Mesto prileganja
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	*5058-5076
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	5379-5401*

R-A/G

N-A/C/G/T

H-A/C/T

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 48 °C.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili vzorce 2084/06, 2243/06,.

Pomnožen pridelek je bil velik 343 bp.

3.2.4.2.3 Pomnoževanje odseka polimeraznega dela sapovirusne nukleinske kisline z začetnimi oligonukleotidi

Sapoviruse smo določili z začetnimi oligonukleotidi (Preglednica 3-6):

- JV33
- SR80

Preglednica 3-6: Nekatere značilnosti začetnih oligonukleotidov JV33 in SR80

(Noel in sod., 1997, Vinje in sod. 2000:533)

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5' → 3'	Mesto prileganja
JV33	GTGTANATGCARTCATCACC	*4666-4685
SR80	TGGGATTCTACACAAAACCC	4868-4888*

Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37 °C.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec 782/06.

Pomnožen pridelek je bil velik 222 bp.

3.2.5 Analiza pridelkov pcr z elektroforezo v agaroznem gelu

V čašo smo natehtali 1g agaroze ter dodali 50 ml 5xTAE pufra. Čašo smo nato dali v mikrovalovno pečico in pustili da 2x zavre, da se je agarosa dobro stopila. Ko se je agarosa ohladila na približno 60 °C smo dodali 5 µl etidijevega bromida in jo zlili v kadičko z glavničkom ter pustili 30 minut da se je strdila. Nato smo zmešali 2 µl barvila nanašalnega barvila (Loading Dye) ter 10 µl vzorca. 10 µl mešanice smo odpipetirali v vdolbinice v gelčku. V eno vdolbinico smo dali 5 µl kilobazne lestvice. Elektroforezo smo pustili teči 50 minut pri 90 mV.

3.2.6 Enostopenjska reakcija verižne reakcije s polimerazo s predhodno transkripcijo v realnem času

Pomnoževanje RNA smo izvedli v termopomnoževalniku Smart Cycler. Uporabili smo reagente proizvajalca Cepheid. V 1.5 ml epruvetki smo pripravili mešanico. Za 2 reakciji smo odpipetirali:

- 23 µl ddH₂O
- 1 kroglica analitskega specifičnega reagenta norovirusnih začetnih oligonukleotidov (Norovirus Primer and Probe Set – Analyte Specific reagent)
- 10 µl enostopenjskega RT-PCR pufra (Qiagen One-Step RT PCR buffer)
- 2 µl enostopenjske RT-PCR dNTP mešanice (Qiagen One-Step RT PCR dNTP mix)

- 2 μl enostopenjske RT-PCR encimske mešanice (Qiagen One-Step RT PCR Enzyme mix)
- 3 μl MgCl_2 (25 mM)

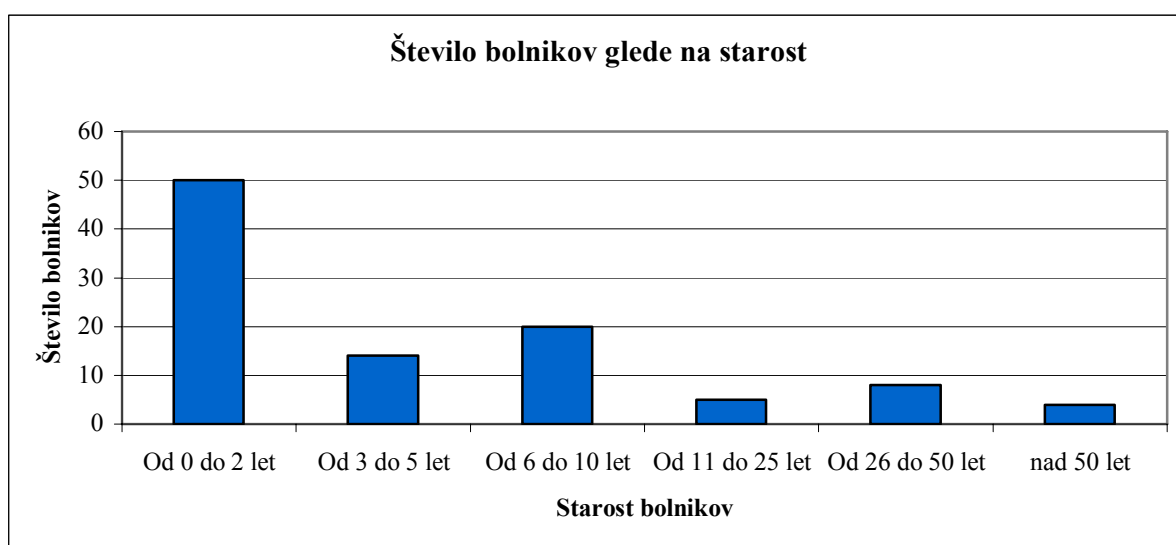
V posebne prilagojene epice za termopomnoževalnik Smart Cycler smo odpipetirali 20 μl pripravljene mešanice ter 5 μl vzorca.

V komercialnem kompletu nismo dobili RNAznega inhibitorja zato ga nismo dodali, manjkal je tudi MgCl_2 (50 mM) zato smo dodali 2x količino 25 mM MgCl_2 , da smo dobili zahtevano koncentracijo.

4 REZULTATI

4.1 ZNAČILNOSTI VZORCEV

Skupno smo pregledali 102 vzorca iztrebkov, ki so bili predhodno pregledani v laboratoriju za Elektronsko mikroskopijo in so bili pozitivni ali z elektronsko mikroskopijo ali s testom ELISA. 40 vzorcev je bilo odvzetih ženskam, 62 pa moškim. Starost bolnikov je bila od nekaj dni pa do 76 let. 62,7 % bolnikov je bilo starih do vključno 5 let (Slika 4-1).



Slika 4-1 : Število obolelih za gastroenteritisom glede na starost. (Uporabljeni so vzorci iztrebkov bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom, ki so jih v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani dobili za rutinsko diagnostiko v obdobju od. 09.07.2006 do 7.10.2006.)

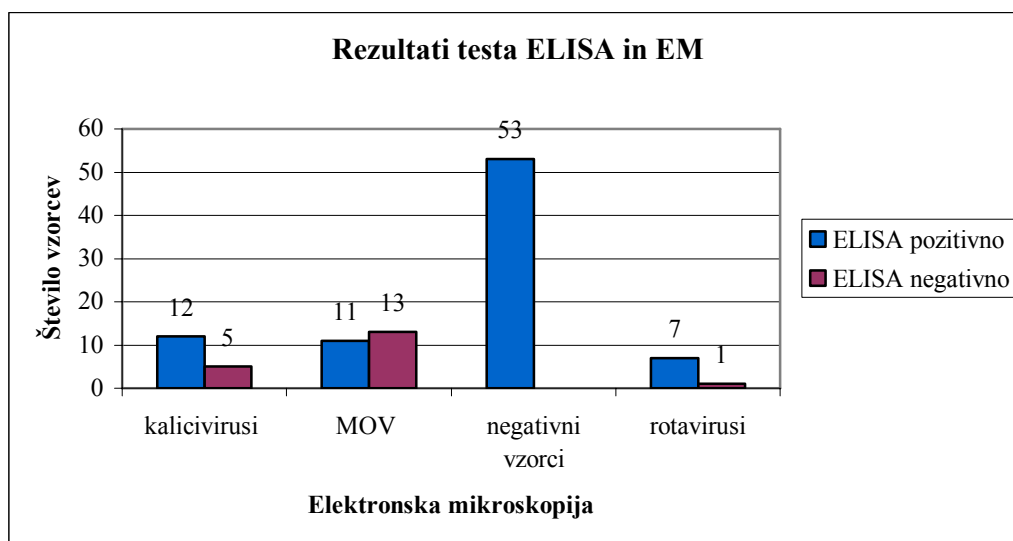
Z elektronskim mikroskopom so morfološko značilne kaliciviruse določili v 17 vzorcih, viruse z nejasno morfologijo - male okrogle viruse v 24 vzorcih ter rotaviruse v 8 vzorcih. Virusov niso našli v 53 vzorcih, vendar so s testom ELISA določili norovirusne antigene (Slika 4-2).

Pri 12 vzorcih od skupno 17, kjer so z elektronsko mikroskopijo določili kaliciviruse so s testom ELISA določili tudi antigene GGI in GGII. Pri 5 vzorcih niso določili antigenov norovirusov (Slika 4-2).

Od 24 vzorcev, ki so bili z elektronsko mikroskopijo določeni kot mali okrogli virusi so antigene GGI in GGII norovirusov določili pri 11 vzorcih. 13 vzorcev je bilo s testom ELISA negativnih (Slika 4-2).

Pri 8 vzorcih, kjer so z elektronsko mikroskopijo določili rotaviruse so pri testu ELISA določili poleg antigenov rotavirusov tudi antigene GGI in GGII norovirusov (Slika 4-2).

Od naključno izbranih vzorcev, pri katerih z elektronsko mikroskopijo niso določili virusov, so pri 47 vzorcih odkrili norovirusne antigene. Pri 6 vzorcih so določili tako norovirusne kot tudi rotavirusne antigene (Slika 4-2).



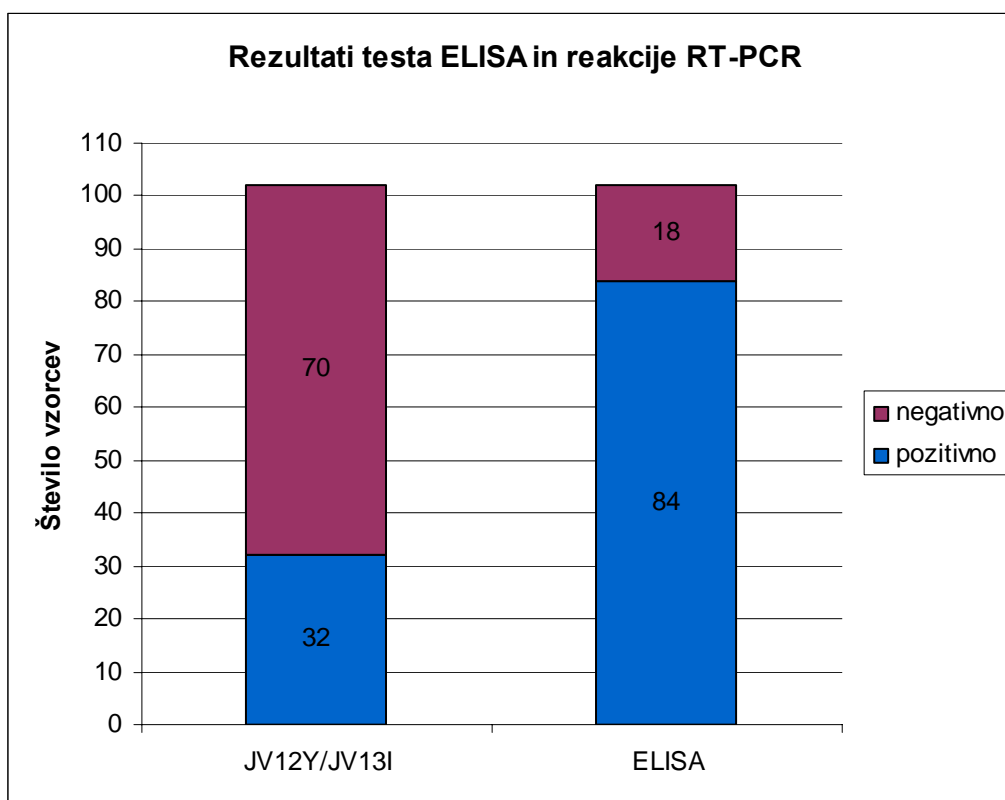
Slika 4-2: Primerjava rezultatov dokazovanja virusnih antigenov z rezultatom elektronske mikroskopije

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

4.2.1 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I

Za pomnoževanje smo uporabili začetne oligonukleotide JV12Y in JV13I. S to reakcijo smo pomnoževali 326 bp dolg odsek RNA vseh vzorcev. Reakcijo smo izvedli s programom, ki je opisan pod točko 3.2.4.1.1. Virusno RNA smo redčili z ddH₂O v razmerju 1:10, pozitivno kontrolo pa v razmerju 1:5. Pozitivna kontrola je bila pri analizah pozitivna. Uporabili smo tudi negativno kontrolo.

Pri 32 vzorcih od skupno 102 smo določili norovirusno RNA. Od tega so z elektronsko mikroskopijo določili kaliciviruse ali male okrogle viruse v 17 vzorcih. Predhodno so pri 26 vzorcih določili tudi norovirusne antigene. Od 70 vzorcev, kjer nismo določili norovirusne RNA, so predhodno določili norovirusne antigene pri 50 vzorcih, pri 8 vzorcih so določili tako norovirusne kot tudi rotavirusne antigene. Od teh 58 vzorcev, so z elektronsko mikroskopijo določili kaliciviruse ali male okrogle viruse v 12 primerih (21 %) (Slika 4-3).



Slika 4-3: Primerjava rezultatov dokazovanja virusnih antigenov z rezultati dokazovanja virusne RNA (začetni oligonukleotidi JV12Y/JV13I)

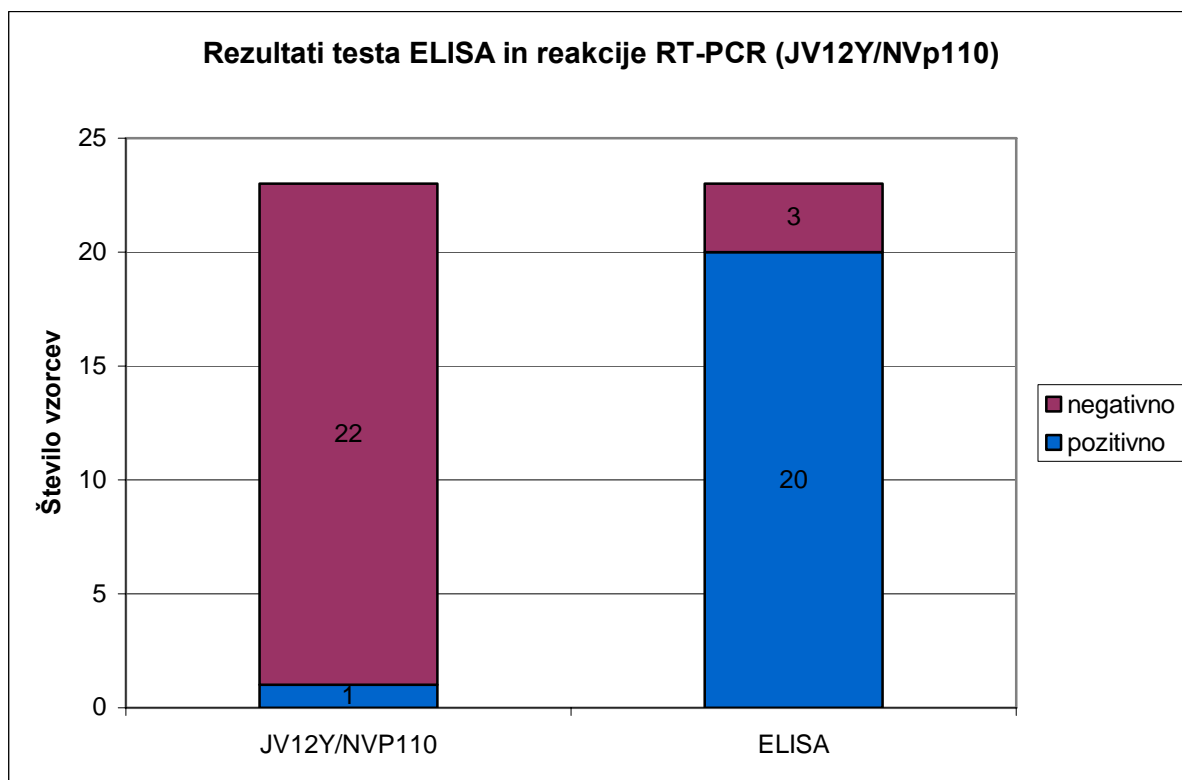
4.2.2 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in NVp110

Reakcijo smo izvedli s programom ki je opisan pod točko 3.2.4.1.2. Pri 23 vzorcih smo z začetnimi oligonukleotidi pomnožili 332 bp dolg odsek RNA. Virusno RNA smo redčili v razmerju 1:10, pozitivno kontrolo pa v razmerju 1:5.

Norovirusno RNA smo določili le pri enem vzorcu, ki je bil z elektronsko mikroskopijo določen kot mali okrogli virus, z encimsko imunskim testom pa so bili določni norovirusni antigeni (Slika 4-4).

Pri 22 vzorcih, kjer nismo določili norovirusne RNA, so predhodno z encimsko imunskim testom določili norovirusne antigene 19 vzorcem. Od teh 19 vzorcev, so z elektronsko mikroskopijo določili kaliciviruse in male okrogle viruse v 53 % (10 primerov) (Slika 4-4).

Pri 22 vzorcih nismo določili norovirusne RNA niti pri pomnoževanju z začetnima oligonukleotidoma JV12Y in NVp110. Norovirusno RNA smo določili le pri enem vzorcu, kateri pa je bil pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in NVp110 negativen (Slika 4-4) .



Slika 4-4: Primerjava rezultatov testa ELISA z rezultati metode RT-PCR (začetni oligonukleotidi JV12Y/NVp110)

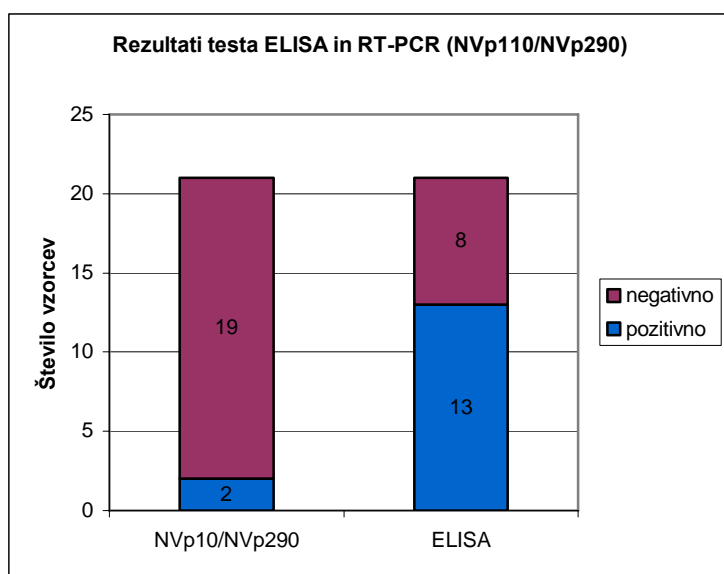
4.2.3 Pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi NVp110 in NVp290

Z začetnimi oligonukleotidi smo pomnožili 294 bp dolg odsek osamljene RNA 21 vzorcev. Reakcijo smo izvedli s programom, ki je opisan pod točko 3.2.4.1.3. Za pomnoževanje smo uporabili začetne oligonukleotide NVp110 in NVp290. Virusno RNA smo redčili v razmerju 1:10, pozitivno kontrolo pa v razmerju 1:5.

Norovirusno RNA smo določili pri 2 vzorcih, pri katerih so bili predhodno določeni tudi norovirusni antigeni. Z elektronsko mikroskopijo pa sta bila določena kot mala okrogla virusa (Slika 4-5).

Pri ostalih 19 vzorcih norovirusne RNA nismo določili. Pri 11 vzorcih so predhodno določili virusne antigene z encimsko imunskim testom. Od 11 vzorcev so z elektronsko mikroskopijo določili kaliciviruse ali male okrogle viruse v 7 primerih (Slika 4-5).

Pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi NVp110 in NVp290 smo norovirusno RNA določili v 2 vzorcih več kot s pomnoževanjem z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in NVP110 (Slika 4-5).



Slika 4-5: Primerjava rezultatov testa ELISA z rezultati metode RT-PCR (začetni oligonukleotidi NVp110/NVp290)

4.3 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA GENOMA NOROVIRUSOV NA ORF2 Z RT-PCR (Access RT-PCR System, Promega)

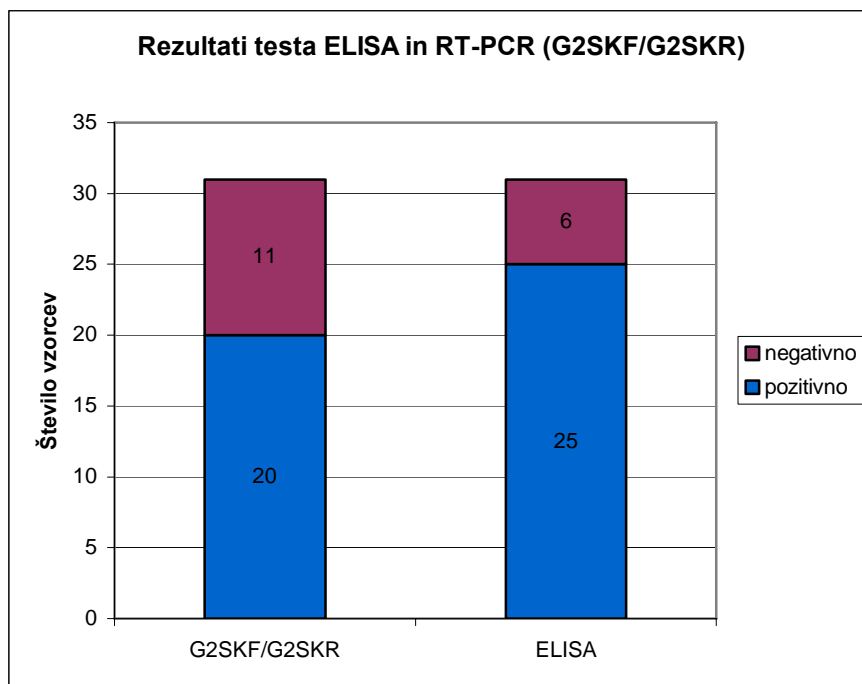
4.3.1 Pomnoževanje odseka genoma norovirusov genske skupine I in II

Tarčni odsek vzorcev v katerih smo z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I določili norovirusno RNA, smo pomnožili z začetnimi oligonukleotidi G2SKF in G2SKR. Pozitiven rezultat je bil 343 bp dolg pomnožen odsek RNA.

V 31 vzorcih smo določili norovirusno RNA pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I. Pri 20 vzorcih smo določili gensko skupino 2. Od teh 20 vzorcev so z

encimsko imunskim testom predhodno določili norovirusni antigen pri 19 vzorcih (Slika 4-6).

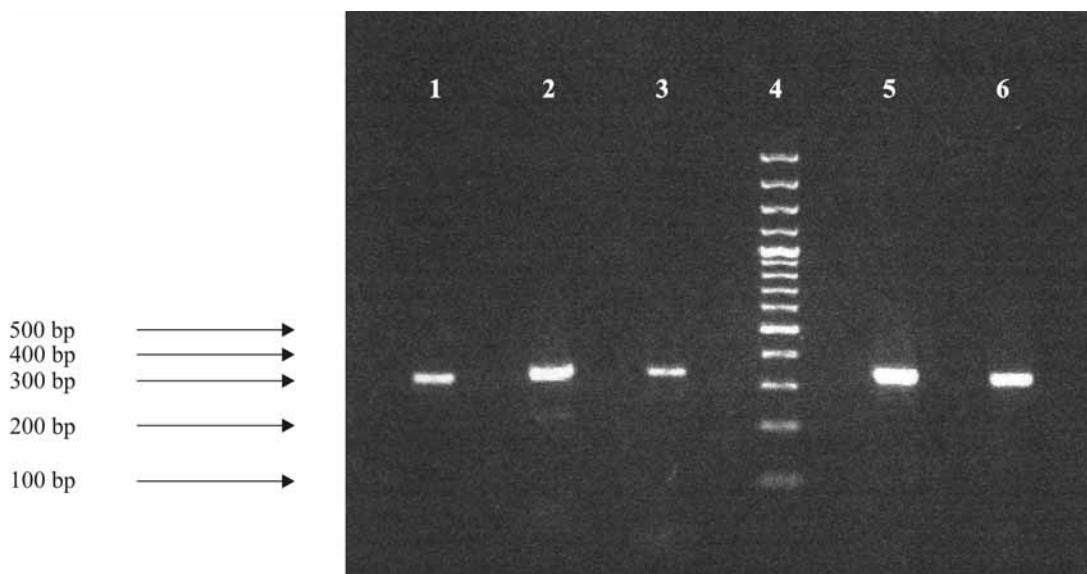
Pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi G1SKF in G1SKR norovirusne RNA GGI nismo določili pri nobenem izmed 10 vzorcev.



Slika 4-6: Primerjava rezultatov testa ELISA z rezultati metode RT-PCR (začetni oligonukleotidi G2SKF/G2SKR)

4.4 Pomnoževanje tarčnega odseka genoma sapovirusov na ORF1 z RT-PCR (Access RT-PCR System, Promega)

Pri pomnoževanju vseh 21 naključno izbranih vzorcev z začetnimi oligonukleotidi SR80/JV33, nismo pri nobenem izmed vzorcev dokazali sapovirusne RNA.



Slika 4-7: Pomnoževanje tarčnih odsekov genoma norovirusov s štirimi pari začetnih oligonukleotidov: JV12Y /JV13I, JV12Y/NVp110, NVp110/NVp290 in G2SKF/G2SKR

Legenda:

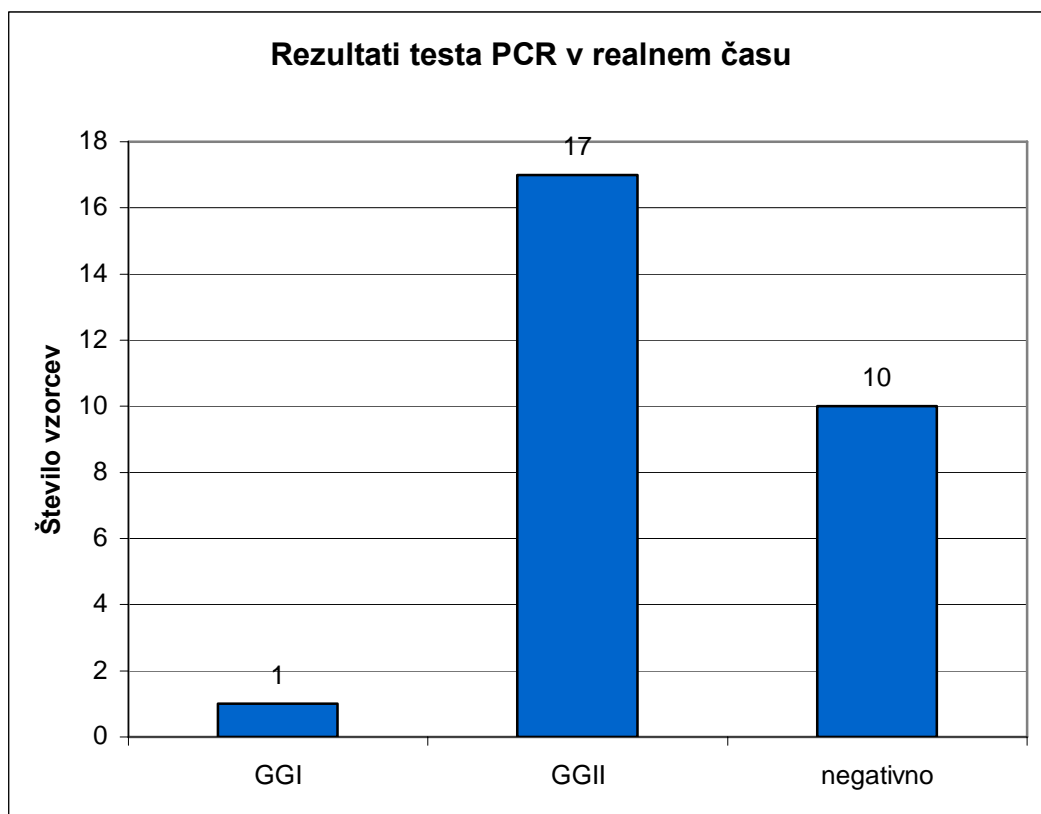
- 1 – vzorec 1620/06 – RT-PCR reakcija je potekala z začetnimi oligonukleotidi JV12Y /JV13I. Pozitiven rezultat je 326 bp velik pridelek pomnoževanja.
- 2 – vzorec 1625/06 - RT-PCR reakcija je potekala z začetnimi oligonukleotidi JV12Y /NVp110. Pozitiven rezultat je 332 bp velik pridelek pomnoževanja.
- 3 – vzorec 1825/06 - RT-PCR reakcija je potekala z začetnimi oligonukleotidi NVp110/NVp290. Pozitiven rezultat je 294 bp velik pridelek pomnoževanja.
- 4 – molekularni označevalec DNA (lestvica 100 bp)
- 5 – vzorec 1605/06 - RT-PCR reakcija je potekala z začetnimi oligonukleotidi NVp110/NVp290. Pozitiven rezultat je 343 bp velik pridelek pomnoževanja.
- 6 – pozitivna kontrola, vzorec 2084/06

4.5 Pomnoževanje tarčnega odseka genoma norovirusov z enostopenjsko reakcijo verižne reakcije s polimerazo s predhodno transkripcijo v realnem času

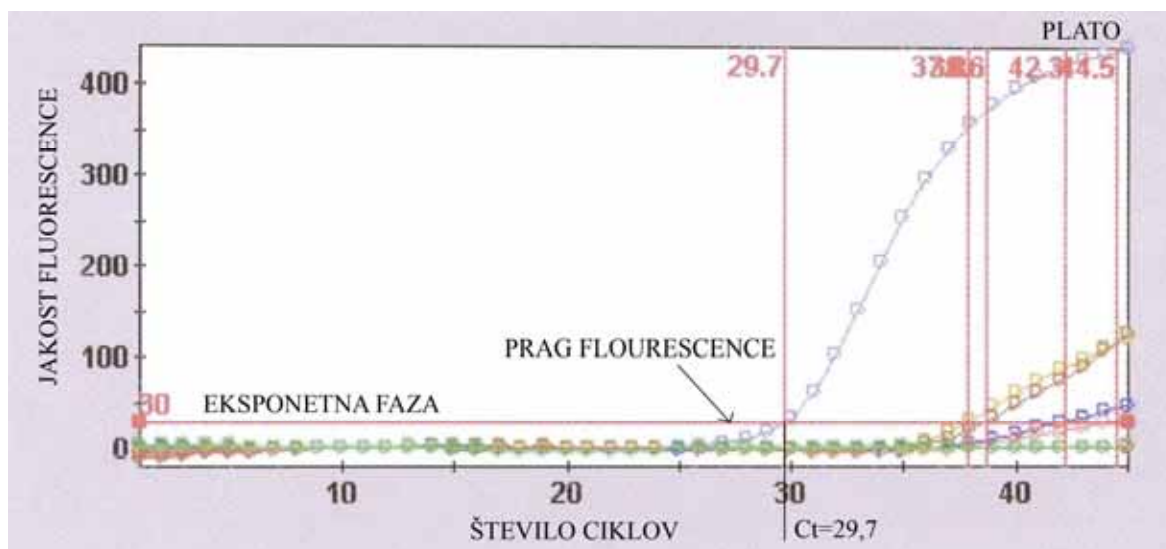
Virusno RNA smo 10x redčili. Od 28 vzorcev smo določili v 17 primerih GGII norovirusov, v 1 primeru GGI norovirusov. Pri 10 vzorcih norovirusne RNA nismo določili.

Od 17 vzorcev, kjer smo določili GGII, so bili predhodno z encimsko imunskim testom določeni antigeni pri 15 vzorcih, od katerih jih je bilo 5 določenih z elektronsko mikroskopijo kot mali okrogli virusi, 7 pa kot kalicivirusi (Slika 4-8).

Eden izmed vzorcev spada v GGI. Predhodno so pri tem vzorcu z encimsko imunsko metodo določili norovirusne antigene (Slika 4-8).



Slika 4-8 : Rezultati reakcije PCR v realnem času



ŠT. VZORCA

■	Norovirusi	1693/06	GGII
■	Norovirusi	1702/06	GGII
■	Norovirusi	1726/06	GGII
■	Norovirusi	1733/06	NEG
■	Norovirusi	1817/06	GGII
■	Norovirusi	1825/06	GGII
■	Norovirusi	1848/06	NEG
■	Norovirusi	1852/06	NEG

Slika 4-9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času.

4.6 ZNAČILNOSTI VZORCEV

20 bolnikov (57%) pri katerih smo v vzorcih določili norovirusno RNA, je bilo mlajših od 3 let. Norovirusno RNA smo določili še v vzorcih 4 otrok starih od 3 do 5 let, 6 otrok starih med 6 do 10 let, 2 bolnikov starih 14 in 15 let, ter pri 2 bolnikih starih 33 in 44 let. Najstarejši bolnik, pri katerem smo določili norovirusno RNA je bil star 62 let. 21 bolnikov pri katerih smo določili norovirusno RNA je bilo moškega spola.

GGI smo potrdili v 1, GGII pa v 27 od 32 z reakcijo PCR pozitivnih vzorcev. V 12,5 % vzorcev, ki smo jih uspešno pomnožili z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I, nismo potrdili GGI ali GGII z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na kapsidnem delu RNA.

GGII smo z reakcijo RT-PCR v realnem času potrdili še v 18 naključno izbranih vzorcih, pri katerih s pomnoževanjem z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I norovirusne RNA nismo določili.

4.7 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST ENCIMSKO IMUNSKEGA TESTA IN POMNOŽEVANJA Z ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI JV12Y IN JV13I

Preglednica 4-1: Specifičnost in občutljivost testa ELISA

	specifičnost	občutljivost
ELISA	17 %	81 %

Izračun specifičnosti in občutljivosti se nahaja v prilogi C.

5 RAZPRAVA

V zadnjih nekaj letih se je povečala pozornost izbruhom gastroenteritisov, ki jih povzročajo virusi. Od razvoja in široke uporabe molekularnih metod za dokazovanje norovirusnih okužb v diagnostičnih laboratorijih je postalo jasno, da so norovirusi takoj za rotavirusi najpogostejši povzročitelji gastroenteritičnih obolenj pri odraslih in otrocih. (Dedman in sod., 1998; Hedlund in sod., 2000; Green in sod., 2001; Rockx, 2004). Glavni razlog za to je izjemno nizka infektivna doza, dobra stabilnost v naravi, široka raznolikost znotraj rodov ter nesposobnost vzpostavitve dolgotrajnega imunskega odziva na okužbo ali bolezen.

Nedavni razvoj občutljivih molekularnih testov za dokazovanje, kvantifikacijo in karakterizacijo vodi do odkritja kako pomembne so okužbe z norovirusi (Lopman in sod., 2002).

Okužimo se lahko z okuženo hrano, vodo ali prenosom iz človeka na človeka. Prenos kalicivirusov iz živali na človeka še ni bil potrjen, vendar zaradi podobnosti v nukleotidnem in aminokislinskem delu genoma, predvidevajo, da so živalski rezervoarji kalicivirusov verjetni (Lopman, 2002).

Največkrat so okužbe rezultat večih dejavnikov. Prenos iz človeka na človeka je lahko po fekalno-oralni poti ter z aerosoli, ki se sproščajo pri bruhanju (Pether in Caul, 1983). Do težave pride največkrat zaradi izredno visoke stopnje obolevnosti (50 %), nizke infektivne doze ter izločanja virusnih delcev do 12 ur pred, ali več tednov po samem pojavu bolezenskih znakov (Cliver, 1997; Kaplan in sod., 1982a).

Do okužb povzročenih z okuženo vodo lahko pride direktno z uživanjem vode ali indirektno preko umitega sadja, kopanja v rekreacijskih vodah, kot so bazeni in jezera (Koopmans in sod., 2002). Posebno pozornost velja nameniti odkritju, da precejšen delež ustekleničene mineralne vode vsebuje kalicivirusno RNA (Beuret in sod., 2000), vendar je potrebno te ugotovitve potrditi še z drugimi metodami (Koopmans in sod., 2002a).

5.1 DOLOČANJE NOROVIRUSNIH ANTIGENOV GGI IN GGII S TESTOM ELISA

Ker je RT-PCR draga in zapletena metoda, za katero je potrebna posebna oprema in usposobljenost so razvili hitrejšo in preprostejšo metodo – test ELISA. Vendar so na podlagi predhodnih ocen ELISA kompletov ugotovili, da IDEIA NLV komplet glede na njihovo nizko občutljivost in/ali specifičnost ne more učinkovito zamenjati RT-PCR metode (Okitsu-Negishi in sod., 2006).

S testom ELISA (Dako) so poskušali določiti norovirusne antigene. Izmed 41 vzorcev, kjer so z elektronsko mikroskopijo določili male okrogle viruse (MOV) ali kaliciviruse, so norovirusne antigene določili v 23 primerih (56 %). V ostalih 19 vzorcih norovirusnih antigenov niso določili. Verjetno so bili prisotni sapovirusi ali sevi norovirusov, ki jih test ELISA ne zajame.

Norovirusne antigene so določili še v 61 primerih. Od tega jih je bilo 8 z elektronsko mikroskopijo določili kot rotavirusi. Od ostalih 53 vzorcev, kjer z elektronsko mikroskopijo niso določili virusov, so pri 6 vzorcih določili tako norovirusne antigene kot tudi antigene rotavirusov.

Da je prišlo do tako majhne občutljivosti elektronsko mikroskopske metode je vzrok verjetno v nizki koncentraciji virusnih delcev v vzorcu, saj meja detekcije znaša približno 10^6 virusnih delcev /gram iztrebka (Atmar in Estes, 2001).

Do težavne morfološke klasifikacije lahko pride tudi kadar virusni pripravki niso sveži, saj odtajevanje in zamrzovanje, učinkovanje proteolitskih encimov in vezava protiteles v črevesju lahko povzroči spremembe, zaradi katerih prepoznavna ni več mogoča (Poljšak-Prijatelj in sod., 2001).

Proizvajalec testa IDEA Norovirus (Dako) navaja podatke o relativni občutljivosti in specifičnosti. Občutljivost znaša 72,8 %, specifičnost pa 100 % glede na predhodna testiranja z RT-PCR metodo. Negativni rezultati naj ne bi izločili možnosti okužbe z norovirusi pri bolnikih, saj je možnih več vzrokov zakaj do detekcije ni prišlo. Možni

vzroki so: pridobitev vzorca ob neprimernem času poteka bolezni, ko je prisotnih premalo virusnih delcev, neprimerno vzorčenje in/ali neprimerna obdelava vzorcev.

De Bruin in sodelavci so ugotovili, da Dako komplet za test ELISA s specifičnostjo 38 % in občutljivostjo 36 % ne detektira dveh rodov GGI in enega rodu GGII. Kljub nizki specifičnosti in občutljivosti, pa se ELISA kit lahko uporablja za predhodna hitra testiranja, kjer bi vse negativne rezultate ponovno testirali z RT-PCR (De Bruin in sod., 2006).

Pri ELISA testu smo imeli 81,3 % občutljivost in 17,1 % specifičnost, kar odstopa od rezultatov dobljenih pri predhodnih študijah, kjer poročajo o 39-55,5 % občutljivosti in 98,3-100 % specifičnosti (Dimitriadis in sod., 2006)

Do tako velikih razlik v specifičnosti in občutljivosti med rezultati naše raziskave in rezultati raziskav objavljenih predhodno, je prišlo zaradi drugačnega nabora vzorcev. Pri naši raziskavi smo uporabili le vzorce sporadičnih primerov, medtem ko so pri ostalih raziskavah uporabili tudi vzorce iz izbruhov. Druga razlika je bila ta, da smo mi vključili le vzorce, ki so bili z elektronsko mikroskopijo določeni kot kalicivirusi ali zaradi nejasne morfologije kot mali okrogli virusi ter vzorce pri katerih smo z ELISA testom določili norovirusne antigene ali antigene tako norovirusov kot rotavirusov. V drugih raziskavah so vključili tudi vzorce, kjer so z elektronsko mikroskopijo določili poleg kalicivirusov, MOV tudi še rotaviruse, astroviruse in adenoviruse.

V raziskavi, ki so jo opravili na Japonskem, kjer so prav tako imeli vzorce sporadičnih primerov, poročajo o 76,3 % občutljivosti in 90,7 % specifičnosti. Občutljivost je dokaj primerljiva z našimi rezultati, medtem ko specifičnost zelo odstopa od naših, zaradi različnih vzorcev vključenih v raziskavo (Okitsu-Negishi in sod., 2006).

5.2 POMNOŽEVANJE TARČNIH ODSEKOV GENOMA NOROVIRUSOV Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO RT-PCR

Z enostopenjsko RT-PCR smo pomnoževali tarčne odseke različnih delov norovirusne RNA.

Številni faktorji lahko vplivajo na specifičnost in občutljivost RT-PCR metode. Pomembna je sama kakovost vzorca, metoda, ki jo uporabljamo za samo osamitev RNA, začetni oligonukleotidi, ki jih uporabimo za pomnoževanje virusne nukleinske kisline. Pomembna je tudi količina virusne RNA ter temperatura pri kateri začetni oligonukleotidi nalegajo pri samem pomnoževanju.

Večina začetnih oligonukleotidov je pripravljenih tako, da pomnožujejo najbolj ohranjene regije genoma, to je od RNA odvisna RNA polimerazna regija. To je pomembno zato, ker lahko pride do rekombinacije virusov, kar pomeni, da oligonukleotidni začetniki niso več enako občutljivi za mesto naleganja, kar privede do manjšega števila pozitivnih rezultatov pri reakciji PCR.

Vzorci pogosto vsebujejo snovi, ki inhibirajo encimsko aktivnost reverzne transkriptaze ter DNA polimeraze uporabljene pri RT-PCR. Zato je izjemno pomembna izbira prave metode osamitve RNA. Pomembno je, da je z metodo omogočena odstranitev ali inaktivacija inhibitorjev RT-PCR reakcije (Atmar in Estes, 2001).

Najprej so norovirusno RNA določali s pomnoževanjem tarčnega odseka na polimeraznem delu z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I, s katerimi dokažemo večino poznanih rodov norovirusov (Vennema in sod., 2002). RNA smo določili pri 32 vzorcih od skupno 102, kjer smo predhodno določili kaliciviruse ali MOV z elektronsko mikroskopijo ali norovirusne antigene s testom ELISA.

Zaradi nizkega števila pozitivnih rezultatov ter možnosti pojavljanja lažno negativnih rezultatov reakcije RT-PCR smo naključne vzorce, kjer nismo določili norovirusne RNA, pomnožili še z začetnimi oligonukleotidi JV12Y/NVp110, ki nalegajo na polimerazni regiji genoma. Prav tako nalegajo na polimerazni regiji genoma začetni oligonukleotidi NVp290 in NVp290, vendar z nekaj baznih parov zamika v primerjavi z JV12Y/JV13I (Le Guyader in sod., 1996; Jiang in sod., 1999). Uporabili smo tudi začetne oligonukleotide

SR80/JV33, ki nalegajo na polimerazni regiji sapovirusov (Vinje in sod., 1999). Pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi JV12Y/NVp110, smo od 23 vzorcev norovirusno RNA dokazali pri enem vzorcu, pri katerem so predhodno določili tudi norovirusne antigene. Norovirusno RNA smo dokazali tudi pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi NVp290 in NVp290 in sicer pri 2 vzorcih od skupno 21. Tudi ta dva vzorca sta bila z elektronsko mikroskopijo določena kot mala okrogla virusa, pri testu ELISA pa so predhodno določili norovirusne antigene. Pri pomnoževanju vseh 21 naključno izbranih vzorcev z začetnimi oligonukleotidi SR80/JV33 nismo pri nobenem izmed vzorcev dokazali sapovirusne RNA.

Nato smo tarčne odseke vseh vzorcev, katerim smo s predhodnim pomnoževanjem z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na polimerazni del norovirusne RNA, pomnožili z začetnimi oligonukleotidi G1SKF in G1SKR ali G2SKF in G2SKR, ki nalegajo na kapsidnem delu genoma norovirusov ali pa z reakcijo RT-PCR v realnem času.

Z reakcijo RT-PCR v realnem času smo naključno pomnožili tudi še nekaj vzorcev, pri katerih s predhodnim pomnoževanjem z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na polimerazni del genoma norovirusne RNA nismo dokazali.

Pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi G1SKF in G1SKR norovirusne RNA GGI nismo določili pri nobenem izmed 10 vzorcev. Smo pa pri 1 vzorcu določili norovirusno RNA GGI in sicer z reakcijo RT-PCR v realnem času. S to reakcijo smo določili norovirusno RNA GGII pri 17 vzorcih. Pri 10 vzorcih norovirusne RNA nismo določili. V 20 vzorcih od skupno 31 smo s pomnoževanjem z začetnimi oligonukleotidi G2SKF in G2SKR določili norovirusno RNA GGII.

Vzrok, da norovirusne RNA GGI in GGII nismo potrdili z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na kapsidnem delu, so lahko spremembe v kapsidnem delu genoma norovirusov ali pojav norovirusov nove genske skupine (Koopmans in sod., 2002b).

Pri reakciji RT-PCR v realnem času smo vzorce večkrat redčili (10x, 100x in 1000x) in dobili več pozitivnih rezultatov, kar pomeni da so bile v vzorcu inhibitorne snovi. Ugotovili smo, da 100x redčenje zadošča, saj so bili tukaj pozitivni že vsi rezultati.

V naši raziskavi smo ugotovili da so od 102 primerov gastroenteritisa, dejansko kot povzročitelji prepoznani norovirusi v 34,3 %. Kar je več kot so poročali v nekaterih predhodnih študijah. Na Nizozemskem naj bi noroviruse prepoznali v 11 % primerov gastroenteritisa. Največja incidenca je pri otrocih pod 5 letom starosti, kar so pokazale tudi naše raziskave (de Wit in sod., 2001) .

Nekaj vzorcev smo določili tudi z metodo hibridiziranja. Ugotovili smo, da prevladuje GGII genotip 4 (*Lordsdale*), ki je tudi v drugih raziskavah po Evropi in Avstraliji najbolj pogosto določen genotip (Kirkwood in sod., 2005, Lopman in sod., 2004).

6 SKLEPI

V vzorcih iztrebkov bolnikov z gastroenteritisom smo določili noroviruse in ugotovili, da se rezultati uporabljenih metod med seboj precej razlikujejo. Pri testu ELISA smo v 84 primerih (82,4 %) določili norovirusne antigene, z reakcijo RT-PCR pa smo določili norovirusno RNA le v 31,4 % vzorcev. Ker se rezultata precej razlikujeta in je delež pozitivnih rezultatov pri bolj občutljivi metodi kot je reakcija RT-PCR precej nižji, sklepamo da je pri testu ELISA prišlo do lažno pozitivnih rezultatov.

Ugotovili smo, da je največji delež virusnih okužb pri otrocih mlajših od 3 let. Večino okužb povzročajo sevi iz GGII genotip 4 (*Lordsdale*). Ker se virusi zelo spreminjajo, je možno, da z obstoječimi metodami nismo določili virusov v vseh vzorcih kjer so bili navzoči.

Ker test ELISA ni zadosti občutljiv in specifičen, da bi predstavljal edino diagnostično metodo za določanje sporadičnih primerov gastroenteritidnih okužb, je potrebno hkrati opravljati še reakcijo RT-PCR.

7 POVZETEK

Z različnimi metodami za določanje norovirusov smo pregledali 102 iztrebka bolnikov z gastroenteritisom. Norovirusne antigene smo s testom ELISA določili v 84 primerih, od katerih je bilo 31 vzorcev z elektronsko mikroskopijo določenih kot kalicivirusi ali mali okrogli virusi. Poleg teh smo v raziskavo vključili še 18 vzorcev, pri katerih so z elektronsko mikroskopijo določili MOV ali kaliciviruse, niso pa določili norovirusnih antigenov.

Z metodo RT-PCR smo pomnoževali tarčne odseke različnih delov norovirusnega genoma. Norovirusno RNA smo najprej pomnoževali z začetnimi oligonukleotidi JV12Y in JV13I, ki nalegajo na polimeraznem delu RNA. Noroviruse smo določili v 32 vzorcih. Nato smo naključno izbranim vzorcem norovirusno RNA pomnožili še z drugimi začetnimi oligonukleotidi (JV12Y/NVp110, NVP110/NVp290), ki prav tako nalegajo na polimeraznem delu RNA in dobili še 3 pozitivne vzorce.

Vse vzorce, pri katerih smo določili norovirusno RNA smo pomnožili še RNA z začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo na kapsidnem delu genoma norovirusov in so specifični za GGI in GGII. GGI nismo potrdili, GGII pa smo potrdili v 20 primerih.

GGI smo potrdili z reakcijo RT-PCR v realnem času v 1 primeru, ter še dodatnih 18 primerov GGII norovirusov. Od teh 18 primerov smo v 4 primerih norovirusno RNA določili tudi z začetnimi oligonukleotidi G2SKF/G2SKR.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati iz drugih raziskav, kjer okužbe z GGII (genotip 4) norovirusov prevladujejo pred okužbami z GGI.

Pri ELISA testu smo imeli 81,3 % občutljivost in 17,1 % specifičnost, kar odstopa od rezultatov dobljenih pri predhodnih študijah.

8 VIRI

Agus S.G., Dolin R., Wyatt R.G., Tousimis A.J., Northrup R.S. 1973. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. *Annals of Internal Medicine*, 79: 18-25.

Ando T., Noel J.S., Fankhauser R.L 2000. Genetic classification of "Norwalk-like viruses." *Journal of Infection Diseases*, 181: S336-348.

Adler J.L., Zickl R. 1969. Winter vomiting disease. *Journal of Infection Diseases*, 119: 668-673.

Atmar R.L., Estes M.K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 15-37.

Beuret C., Kohler D., Luthi T. 2000. Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *Journal of Food Protection*, 63: 1576-1582

Caul E.O. 1994. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet*, 343: 1240-1242.

Caul E.O. 1996. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective. *Journal of Clinical Pathology*, 49: 874-880.

Caul E.O. 1996. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective. *Journal of Clinical Pathology*, 49: 959-964.

Caul E.O., H. Appleton 1982. The electron microscopical and physical characteristics of

- small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *Journal of Medical Virology*, 9: 257-265.
- Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., Honoma S. 2000. Sapporo virus: history and recent findings. *Journal of Infection Diseases*, 181: S303-308.
- Clarke I.N., Lambden P.R., Caul E.O. 1998. Human enteric RNA viruses: caliciviruses and astroviruses. V: *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. Mahy B.W.J., Collier L. (eds.). London, Arnold, 511-535
- Cliver D.O. 1997. Viral zoonoses and food of animal origin: caliciviruses and human diseases. *Archives of Virology*, 50: 90-101
- Cubitt W.D., Jiang X.J., Wang J., Estes M.K. 1994. Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. *Journal of Medical Virology*, 43: 252-258.
- Dedman D., Laurichesse H., Caul E.O. Wall P. 1998. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-1995. *Epidemiology and Infection*, 121: 139-149
- De Bruin E., Duizer E., Vennema H., Koopmans M.P., 2006. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 137: 259-264
- De Wit M.A., Koopmans M.P., Kortbeek L.M., van Leeuwen N.J., Bartelds A.I., van Duynhoven Y.T. 2001. Gastroenteritis in sentinel general practices. Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 82-91
- De Leon R., Matsui S.M., Baric R.S., Herrmann J. E. Blacklow N. R. Greenberg H. B., Sobsey M. D. 1992. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *Journal of*

Clinical Microbiology, 30: 3151-3157

Desselberger U., Gray J. 2003. Norwalk- and Sapporo-like viruses (human caliciviruses). V: Viral gastroenteritis. Desselberger U., Gray J. (eds). Amsterdam, Elsevier: 447-453

Dingle J.H. McCorkle L.P., Badger G.F., Curtiss C., Hodges R.G., Jordan W.S. 1956. A study of illness in a group of Cleveland families. XXXI. Clinical description of acute nonbacterial gastroenteritis. American Journal of Hygiene, 64: 368-375

Dingle K.E., Lambden P.R., Caul E.O., Clarke I.N. 1995. Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. Journal of Genetic Virology, 76: 2349-2355.

Dimitriadis A., Bruggink L.D., Marshall J.A. 2006. Evaluation of the Dako IDEIA norovirus EIA assay for detection of norovirus using faecal specimens from Australian gastroenteritis outbreaks. Pathology, 38:157-165

Doane F.W. 1994. Electron microscopy for the detection of gastroenteritis viruses. V: Viral infections of gastrointestinal tract. 2nd ed. Kapikian A.Z. (ed.). New York. Marcel Dekker: 101-130

Dolin R., Baron S. 1975. Absence of detectable interferon in jejunal biopsies, jejunal aspirates, and sera in experimentally induced viral gastroenteritis in man. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 150: 337-339.

Dolin R., Levy A.G., Wyatt R.G., Thornhill T.S., Gardner J.D. 1975. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. American Journal of Medicine, 59: 761-768.

Dolin R., Reichman R.C., Roessner K.D., Tralka T.S., Schooley R.T., Gary W., Morens D. 1982. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of

acute viral gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 146: 184-189.

BioSystem Development . 2002. Protein analysis- Pharmaceutical development: ELISA. Middleton, BioSystem Development: 1str.
www.biosystemdevelopment.com/technology.htm (Avgust 2007)

Estes M.K., Atmar R.L., Hardy M.E. 1997. Norwalk and related diarrhea viruses. V: *Clinical virology*. 3rd ed. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (eds.). New York, Churchill Livingstone: 1073-1095

Farkas T., Zhong W.M., Jing Y., huang P.W., Espinosa S.M., Martinez N., Morrow A.L., Ruiz-Palacois G.M, Pickering L.K., Jiang X. 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology*, 149: 1309-1323.

Glass P.J., White L.J., Ball J.M., Lepare-Goffart I., Hardy M.E., Estes M.K. 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *Journal of Virology*, 74: 6581-6591.

Graham D.Y., Jiang X., Tanaka T., Opekun A.R., Madore H.P., Estes M.K. 1994. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *Journal of Infectious Diseases*, 170: 34-43.

Gray J. J., Cunliffe C., Ball J., Graham D.Y., Desselberger U., Estes M.K. 1994. Detection of immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG Norwalk virus-specific antibodies by indirect enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed Norwalk virus capsid antigen in adult volunteers challenged with Norwalk virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 3059-3063.

Green K., Ando T., Balayan M., Berke T., Clarke i., Estes M., Matson D., Nakata S., Neill J., Studdert M., Thiel H. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S322-S330.

- Green K., Chanock R.M., Kapikian A. Z. 2001. Human caliciviruses. V: Fields virology, 4th ed. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 841-874
- Green K.Y., Lew J.F., Jiang X., Kapikian A.Z., Estes M.K. 1993. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 2185-2191.
- Greenberg H.B., Valdesuso J., Kapikian A.Z., Chanock R.M., Wyatt R.G., Szmuness W., Larrick J., Kaplan J., Gilman R.H., Sack D.A. 1979. Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. *Infection Immunology*, 26: 270-273.
- Greenberg H.B., Valdesuso J., Kalica A.R., Wyatt R.G., McAuliffe V.J., Kapikian A.Z., Chanock R.M. 1981. Proteins of Norwalk virus. *Journal of Virology*, 37: 994-999.
- Gutierrez-Escolano A.L., Uribe-Brito Z., del Angel R.M., Jiang X. 2000. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *Journal of Virology*, 74: 8558-8562.
- Gutierrez-Escolano A.L., Vazquez-Ochoa M., Escobar-Herrera J., Hernandez-Acosta J. 2003. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311: 759-766.
- Hardy M.E., Estes M.K. 1996. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes*, 12: 287-290.
- Hedberg C.W., Osterholm M.T. 1993. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clinical Microbiology*, 6: 199-210.
- Hedlung K.O., Rubilar-Abreu E., Svensson L. 2000. Epidemiology of calicivirus infections

in Sweden. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S275-280

Herrmann J.E., Blacklow N.R., Matsui S.M., Lewis T.L., Estes M.K., Ball J.M., Brinker J.P. 1995. Monoclonal antibodies for detection of Norwalk virus antigen in stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2511-2513.

Jiang X., Wang J., Graham D.J., Estes M.K. 1992a. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2529-2534.

Jiang X., Wang M., Graham D.J., Estes M.K. 1992b. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology*, 66: 6527-6532.

Jiang X., Graham D.J., Wang M., Estes M.K. 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 195: 51-61.

Jiang X., Wilton N., Zhong W.M., Farkas T., Huang P.W., Barrett E., Guerrero M., Ruiz-Palacios G., Green K.Y., Green J., Hale A.D., Estes M.K., Pickering L.K., Matson D.O. 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S349-S359.

Jiang X., Zhong W., Kaplan M., Pickering L.K., Matson D.O. 1999. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *Journal of Viral Methods*, 78: 81-91

Le Guyader F., Estes M.K., Hardy M.E., Neill F.H., Green J., Brown D.W., Atmar R.L. 1996. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Archives of Virology*, 141: 2225-2235

Kapikian A.Z., Almeida J.D., Scott E.J. 1972. Immune electron microscopy of rhinoviruses. *Journal of Virology*, 10: 142-146.

- Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10: 1075-1081.
- Kapikian A.Z., Estes M.K., Chanock R.M. 1996. Norwalk group of viruses. V: *Fields virology*. 3rd ed. Fields B.N., Knipe D.M., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B., Straus S.E. (eds.). Philadelphia, New York, Lippincott-Raven Publishers, 783-810
- Kaplan J.E., Feldman R., Campbell D.S., Lookabaugh C., Gary G.W. 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *American Journal of Public Health*, 72: 1329-1332.
- Kojima S., Kageyama T., Fukushi S., Hoshino F.B., Shinohara M., Uchida K., Takeda N., Katayama K.. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of Virological Methods*, 100: 107-114.
- Koopmans M., Vennema H., Heersma H., van Strien E., van Duynhoven Y., Brown D., Reacher M., Lopman B.. 2003. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerging Infections Diseases*, 9:1136-1142.
- Koopmans M., E. Duizer 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 23-41.
- Koopmans M., von Bonsdorff C.H., Vinje J., de Medici D., Monroe S. 2002a. Foodborne viruses. *FEMS Microbiological Reviews*, 26: 137-160
- Koopmans M., van Strien E., Vennema H. 2002b. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses. V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 509-540
- Koren S., Marin J. 1998. Razmnoževanje virusov. V: *Splošna medicinska virologija*.

Koren S. (ur). Ljubljana, Medicinski razgledi: 23-35

Lambden P.R., Caul E.O., Ashley C.R., Clarke I.N. 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*, 259: 516-519.

Liu B., Clarke I.N., Caul E.O., Lambden P.R., 1997. The genomic 5' terminus of Manchester calicivirus. *Virus Genes*, 15,1: 25-28.

Liu B. L., Clarke I.N., Caul E.O., Lambden P.R. 1995. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Archives of Virology*, 140: 1345-1356.

Lopman B., Vennema H., Kohli E., Pothier P., Sanchez A., Negredo A., Buesa J., Schreier E., Reacher M., Brown D., Gray J., Iturriza M., Gallimore C., Bottiger B., Hedlund K.O., Torven M., von Bonsdorff C.H., Manula L., Poljsak-Prijatelj M., Zimsek J., Reuter G., Szücs G., Melegh B., Svennson L., van Duynhoven Y., Koopmans M. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 363: 682-688.

Lopman B.A., Brown D.W., Koopmans M. 2002. Human caliciviruses in Europe. *Journal of Clinical Virology*, 24: 137-160.

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

Meeroff J.C., Schreiber D.S., Trier J.S., Blacklow N.R. 1980. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Annals of Internal Medicine*, 92: 370-373.

Meyers G., Wirblich C., Thiel H.J. 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular

cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, 184: 664-676.

Noel J.S., Ando T., Leite J.P., Green K.Y., Dingle K.E., Estes M.K., Seto Y., Monroe S.S., Glass R.I. 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *Journal of Medical Virology*, 53: 372-383.

Noel J.S., Liu B.L., Humphrey C.D., Rodriguez E.M., Lambden P.R., Clarke I.N., Dwyer D.M., Ando T., Glass R.I., Monroe S.S.. 1997. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *Journal of Medical Virology*, 52: 173-178.

Numata K., Hardy M.E., Nakata S., Chiba S., Estes M.K. 1997. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Archives of Virology*, 142: 1537-1552.

Okitsu-Negishi S., Okame M., Shimizu Y., Phan T.G., Tomaru T., Kamijo S., Sato T., Yagyu F., Muller W.E., Ushijima H. 2006. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3784-3786

Pang X.L., Honma S., Nakata S., Vesikari T. 2000. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S288-S294.

Parashar U.D., Dow L., Frankhauser R.L., Humphrey C.D., Miller J., Ando T., Williams K.S., Eddy C.R., Noel J.S., Ingram T., Bresse J.S., Monroe S.S., Glass R.I. 1998. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiology and*

Infection, 121: 615-621.

Parashar U.D., Glass R.I. 2003. Viral causes of gastroenteritis. V: Viral gastroenteritis. Desselberger U., Gray J. (eds.). Atlanta, Elsevier Science: 9-21.

Parrino T.A., Schreiber D.S., Trier J.S., Kapikian A.Z., Blacklow N.R. 1977. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. New England Journal of Medicine, 297: 86-89.

Pether J.V., Caul E.O. 1983. An outbreak of food-borne gastroenteritis in two hospitals associated with a Norwalk-like virus. Journal of Hygiene (London), 91: 343-350.

Poljšak-Prijatelj M., Frelih T., Zimšek J., Berce I., Barlič-Maganja D. 2001. Kalicivirusi – povzročitelji epidemičnega gastroenteritisa pri otrocih v vrtcu – izkušnje v Sloveniji. Zdravniški vestnik: 70, 619-622.

Prasad B. V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. 1999. X-Ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science, 286: 287-290.

Rockx B. 2004. Norovirus infections. Thesis. Utrecht, University Utrecht: 10-11.

Schreiber D.S., Blacklow N. R., Trier J.S. 1973. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. New England Journal of Medicine, 288: 1318-1323.

Schreiber D.S., Blacklow N.R., Trier J.S. 1974. The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. Journal of Infection Diseases, 129:705-708.

Thornhill T.S., Wyatt R.G., Kalica A.R., Dolin R., Chanock R.M., Kapikian A.Z. 1977. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. Journal of Infection

Diseases, 135: 20-27.

Vennema H., de Bruin E., Koopmans M.. 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, 25: 233-235.

Vial P.A., Kotloff K.L., Tall B.D., Morris Jr . J.G., Levine M.M. 1990. Detection by immune electron microscopy of 27-nm viral particles associated with community-acquired diarrhea in children. *Journal of Infection Diseases*, 161: 571-573.

Vinje J., Deijl H., van der Heide R., Lewis D., Hedlund K.O., Svensson L., Koopmans M. 2000. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38,2: 530-536

Vinje J., Koopmans M. P. 2000. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2595-2601.

White L.J., Ball J.M. 1996. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *Journal of Virology*, 70: 6589-6597.

Wyatt R.G., Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H.L., Buscho R.F., Thornhill T.S., Kapikian A.Z., Chanock R.M. 1974. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *Journal of Infection Diseases*, 129: 709-714.

Yamazaki K., Oseto M., Seto Y., Utagawa E., Kimoto T., Minekawa Y., Inouye S., Yamazaki S., Okuno Y., Oishi I. 1996. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and sequence analysis of small round-structured viruses in Japan. *Archives of Virology*, Suppl. 12: 271-276.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Tatjani Avšič-Županc za mentorstvo, dr. Mateji Poljšak-Prijatelj za somentorstvo, strokovno vodenje pri delu in pomoč pri izdelavi diplomske naloge ter doc. dr. Miroslavu Petrovcu za recenzijo.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Katarini Kovač, Ireni Šest ter Andreju Steyer, ki so mi pomagali, ko je šlo kaj narobe in se z mano veselili pozitivnih rezultatov. Zagotovo bi bilo brez njih in njihovih nasvetov delo težje.

Hvala Blažu za zaupanje vame, optimizem, dobro voljo, pomoč pri izdelavi diplomske naloge ter za prenašanje mojih muh. ☺

Hvala vsem prijateljem za nepozabne skupne študijske in izven študijske dejavnosti.

Nazadnje bi se rada zahvalila še moji družini, ki mi že celo življenje stoji ob strani in verjame vame in v moje sanje.

PRILOGE:

Priloga A: Značilnosti vzorcev uporabljenih v raziskavi

VZOREC 2006	PCR JV12Y/JV13I	PCR JV12Y/NVp110	PCR NVP110/NVP290	RT-PCR v realnem času	PCR G1SKP/G1SKR	PCR G2SKF/G2SKR	PCR SR80J33	ELISA GI	ELISA GII	EM
1559	-	-	-				-			MOV
1565	+	-	-	+ GII			-			MOV
1566	-						-	+		-
1567	-						-	+		-
1593	-						-	+		-
1597	+					+		+		-
1600	+					+		+		-
1602	-						-	+		-
1605	+					+		+		- / MOV
1608	-						-	+		-
1610	+					+		+		-
1617	-						-			MOV
1618	-			+ GII			-	+		kalicivirusi
1620	+					+		+		-
1624	+						-	+		-
1625	-	+					-	+		MOV
1626	+					+		+		kalicivirusi
1629	-						-	+		-
1636	+					+		+		kalicivirusi
1641	-						-	+		- / MOV
1645	+					+		+		kalicivirusi
1646	-						-	+		-
1659	-						-	+		kalicivirusi
1660	-						-	-		rotavirusi
1667	-						-	+		-
1669	+					+		+		-
1672	-						-	-		MOV
1674	-						-	+		-
1675	-						-	+		-
1680	-						-	+		rotavirusi
1681	+					+		+		-

se nadaljuje

Priloga B: Značilnosti vzorcev v katerih smo določili norovirusno RNA

VZOREC 2006	PCR JV12Y/JV13I	PCR JV12Y/NVp110	PCR NVP110/NVP290	RT-PCR v realnem času	PCR G1SKF/G1SKR	PCR G2SKF/G2SKR	PCR SR80/JV33	ELISA GI	EM
1565	+	-	-	+ GII	-	-	-	-	MOV
1597	+	-	-		-	+		+	-
1600	+	-	-			+		+	-
1605	+	-	-			+		+	- / MOV
1610	+	-	-			+		+	-
1618	-	-	-	+ GII			-	+	kalicivirusi
1620	+	-	-	+GII	-	+		+	-
1624	+	-	-	+GII	-	-		+	-
1626	+	-	-	+GII	-	+		+	kalicivirusi
1636	+	-	-	+GII		+		+	kalicivirusi
1641	-	-	-	+GII			-	+	- / MOV
1645	+	-	-		-	+		+	kalicivirusi
1646	-	-	-	+GII				+	-
1659	-	-	-	+GII			-	+	kalicivirusi
1669	+	-	-	+ GII		+		+	-
1681	+	-	-			+		+	-
1693	-	-	-	+ GII			-	+	MOV
1702	+	-	-	+ GII	-	-		+	MOV
1708	+	-	-			+		+	MOV
1726	+	-	-	+ GII		-	-	+	kalicivirusi
1728	+	-	-			+		+	-
1769	+	-	-			+		+	-
1811	+	-	-			+		+	-
1817	-	-	-	+ GII			-	+	MOV
1825	-	-	+	+ GII			-	+	MOV
1826	+	-	-	+ GII		-		+	kalicivirusi
1836	+	-	-			+		-	kalicivirusi
1870	+	-	-	+GII		-		-	MOV
1872	+	-	-			+		+	-
1918	+	-	-			+		+	-
1923	+	-	-	+GI				+	-
1929	+	-	-	+GII				+	-
2107	+	-	-		-	+		+	kalicivirusi
2160	+	-	-			+		+	kalicivirusi
2167	+	-	-			+		+	kalicivirusi

Priloga C: Izračun specifičnosti in občutljivosti testa ELISA

PCR +	ELISA +	26
PCR +	ELISA -	6
PCR -	ELISA +	58
PCR -	ELISA -	12
		102

PCR -	70	PCR, ELISA -	12
PCR +	32	PCR, ELISA +	26

$$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{\text{Št. neg. PCR +ELISA}}{\text{vsi PCR neg.}} = \frac{12}{70} = 17,10 \%$$

$$\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{\text{Št. poz. PCR +ELISA}}{\text{vsi PCR poz.}} = \frac{26}{32} = 81,30 \%$$