

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ida KRALJ

**DOLOČANJE ROTAVIRUSNIH GENOTIPOV PRI  
HOSPITALIZIRANIH OTROCIH Z GASTROENTERITISOM**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF ROTAVIRUS GENOTYPE IN HOSPITALIZED  
CHILDREN WITH GASTROENTERITIS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, v laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Avšič-Županc, za somentorico dr. Matejo Poljšak-Prijatelj in za recenzenta prof. dr. Srečka Korena.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

Somentorica: dr. Mateja Poljšak-Prijatelj

Recenzent: prof. dr. Srečko Koren

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tatjano AVŠIČ-ŽUPANC

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

Član: dr. Matejo POLJŠAK-PRIJATELJ

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

Član: prof. dr. Srečko KOREN

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ida Kralj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.7 : 578.823 : 578.5 (043)=863
KG	virusi/človeški rotavirusi/gastroenteritis pri otrocih/genotipizacija/RT-PCR /vgnezdena PCR/komplet Rotavirus 280/genotip G (VP7)/genotip P (VP4)
AV	KRALJ, Ida
SA	AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (somentorica)/KOREN, Srečko (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	DOLOČANJE ROTAVIRUSNIH GENOTIPOV PRI HOSPITALIZIRANIH OTROCIH Z GASTROENTERITISOM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 58 str., 16 pregl., 16 sl., 3 pril., 77 vir.
IJ	SI
JJ	sl/en
AI	Rotavirusi skupine A so najpogostejši povzročitelji akutnega gastroenteritisa pri novorojenčkih in majhnih otrocih, starih do 5 let. Zaradi velikega števila hospitalizacij in visoke stopnje smrtnosti je nujno potreben razvoj kakovostnega in učinkovitega cepiva. Ker sestava cepiv temelji na najpogostejših genotipih/serotipih, ki krožijo v okolju, je potrebno spremljanje le-teh. Iz vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok smo osamili rotavirusno dvojnovijačno RNA. Z enostopenjsko reakcijo reverzne transkripcije in pomnoževanja smo prepisali odsek gena G, ki kodira protein VP7, in odsek gena P, ki kodira protein VP4. Produkta te reakcije smo uporabili za genotipizacijo s specifičnimi notranjimi začetnimi oligonukleotidi za gen G ali gen P. Produkta pomnoževanja smo določili z gelsko elektroforezo. V rotavirusni sezoni 2005/06 smo določili pogostejša genotipa G1P[8] in G9P[8]. Določili smo en primer G2P[4]. Prvič smo v Sloveniji dokazali genotipe G12P[8], G9P[4] in G2P[14]. Pojavljale so se tudi mešane okužbe G1G3P[8] in G3G9P[8]. Preizkusili smo nov komercialni komplet Rotavirus 280, ki je uporaben za hitro molekularno diagnostiko rotavirusnih okužb.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 578.7 : 578.823 : 578.5 (043)=863  
CX viruses/human rotaviruses/gastroenteritis/children/genotyping/kit Rotavirus 280/genotype G (VP7)/ genotype P (VP4)  
AU KRALJ, Ida  
AA AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (co-advisor)/KOREN, Srečko (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2007  
TI DETERMINATION OF ROTAVIRUS GENOTYPE IN HOSPITALIZED CHILDREN WITH GASTROENTERITIS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 58 p., 16 tab., 16 fig., 3 ann., 77 ref.  
LA Sl  
AL sl/en  
AB Group A rotaviruses are the major cause of acute gastroenteritis in infants and young children under the age of five. Because of high number of hospitalisations and mortality rate worldwide, qualitative and efficacious vaccine development is needed. Vaccine development is based on most prevalent rotavirus genotypes/serotypes, for this reason surveillance of rotavirus strains is needed. The rotavirus double stranded RNA was isolated from stool samples of hospitalized children. The RNA was used as a template for one step reverse transcription and amplification of gene G (encoding VP7) or gene P (encoding VP4). The amplification products were used for genotyping with specific primers for gene G or gene P. All amplified products were determined by the gele electrophoresis. In rotavirus season 2005/06 the most prevalent genotypes were G1P[8] and G9P[8]. We determined one genotype G2P[4]. For the first time in Slovenia G12P[8], G9P[4] and G2P[14] were detected. There were also mixed infections with G1G3P[8] and G3G9P[8]. A new comercial kit Rotavirus 280 was found to be useful for rapid molecular diagnostics of rotavirus infections.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINA	3
2.2 KLASIFIKACIJA	3
2.3 ZGRADBA	4
<b>2.3.1 Genom</b>	<b>4</b>
<b>2.3.2 Proteini</b>	<b>6</b>
2.4 RAZMNOŽEVANJE IN PATOGENEZA	8
2.5 KLINIČNE ZNAČILNOSTI	9
2.6 ZDRAVLJENJE	10
2.7 DIAGNOSTIKA	10
<b>2.7.1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay ali encimskoimunski test)</b>	<b>10</b>
<b>2.7.2 Elektronska mikroskopija (negativno kontrastiranje)</b>	<b>10</b>
<b>2.7.3 PAGE, PCR in mikromrže</b>	<b>11</b>
2.8 EPIDEMIOLOGIJA	12
<b>2.8.1 Obolevnost in smrtnost</b>	<b>12</b>
<b>2.8.2 Prenos in preventiva</b>	<b>13</b>
<b>2.8.3 Sezonsko porajanje epidemij</b>	<b>14</b>
<b>2.8.4 Evolucijski mehanizmi</b>	<b>14</b>
<b>2.8.5 Molekularna epidemiologija</b>	<b>15</b>
2.9 CEPIVA	16
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1 MATERIALI	18
<b>3.1.1 Materiali in vzorci za osamitev RNA s Trizolom</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Reagenti za reakcijo PCR</b>	<b>18</b>
<b>3.1.3 Material za analizo produkta PCR</b>	<b>20</b>
<b>3.1.4 Laboratorijska oprema in aparature</b>	<b>20</b>
3.2 METODE DELA	22

<b>3.2.1 Shema poteka dela</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2 Osamitev RNA</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3 Molekularno določanje rotavirusne RNA z enostopenjsko reakcijo reverzne transkripcije in pomnoževanja DNA (RT-PCR)</b>	<b>23</b>
<b>3.2.4 Molekularno določanje rotavirusne RNA z reverzno transkripcijo in pomnoževanjem DNA</b>	<b>25</b>
<b>3.2.5 Reakcija PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (vgnezdena PCR)</b>	<b>26</b>
<b>3.2.6 Analiza produktov RT-PCR in PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi</b>	<b>30</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>31</b>
4.1 DOLOČANJE GENA G Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO REVERZNE TRANSKRIPCije IN POMNOŽEVANJA DNA (Access RT PCR System)	31
4.2 DOLOČANJE GENA P Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO REVERZNE TRANSKRIPCije IN POMNOŽEVANJA DNA (Access RT PCR System)	31
4.3 DOLOČANJE ROTAVIRUSNE RNA S KOMERCIALNIM KOMPLETOM Rotavirus 280	32
4.4 GENOTIPIZACIJA GENA G, PCR S SPECIFIČNIMI NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (vgnezdena PCR)	33
4.5 GENOTIPIZACIJA GENA P, PCR S SPECIFIČNIMI NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (vgnezdena PCR)	34
4.6 ZNAČILNOSTI VZORCEV	35
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>39</b>
5.1 DOLOČANJE GENA G IN P Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO REVERZNE TRANSKRIPCije IN POMNOŽEVANJA DNA (Access RT PCR System)	39
5.2 DOLOČANJE ROTAVIRUSNE RNA S KOMERCIALNIM KOMPLETOM Rotavirus 280	40
5.3 GENOTIPIZACIJA GENOV G IN P S SPECIFIČNIMI NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (vgnezdena PCR)	41
5.4 ZNAČILNOSTI VZORCEV	43
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>46</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>47</b>
<b>8 SUMMARY.....</b>	<b>48</b>
<b>9 VIRI .....</b>	<b>49</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1.	Dolžine odsekov RNA in proteini, ki jih določen odsek kodira (Desselberger, 1998: 541).	4
Preglednica 2-2.	Molekulska masa, število aminokislin in delež proteina v virionu (Estes in Cohen, 1989).	6
Preglednica 2-3.	Kje najdemo rotaviruse določenih skupin (Kapikian in Chanock, 1990).	7
Preglednica 2-4.	Rotavirusne okužbe v Sloveniji od leta 1998, po mesecih (Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, 2006).	14
Preglednica 3-1.	Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR s komercialnim kompletom Access RT-PCR System.	24
Preglednica 3-2.	Pomembne značilnosti začetnih oligonukleotidov Beg9, End9, con2 in con3.	24
Preglednica 3-3.	Program RT-PCR za pomnoževanje gena G in gena P (komercialni komplet Access RT-PCR System).	25
Preglednica 3-4.	Program za pomnoževanje rotavirusne cDNA (komercialni komplet Rotavirus 280).	26
Preglednica 3-5.	Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi ( <i>Go Taq</i> polimeraza, za določanje genotipov G in P).	26
Preglednica 3-6.	Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi ( <i>Tfi</i> DNA polimeraza, za določanje genotipa P[8]).	27
Preglednica 3-7.	Pomembne značilnosti začetnih oligonukleotidov aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8 in aFT9.	27
Preglednica 3-8.	Pomembne značilnosti začetnih oligonukleotidov 1T-1A, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1 in SE-1.	28
Preglednica 3-9.	Program za pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi za gen G.	29
Preglednica 3-10.	Program za pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi za gen P.	29

Preglednica 3-11.	Program za pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi za genotip P[8] ( <i>Tfi</i> polimeraza).	29
Preglednica 4-1.	Rezultati preizkušanja komercialnega kompleta Rotavirus 280.	33



## KAZALO SLIK

Slika 2-1.	Odseki RNA in proteini, ki jih kodirajo ti odseki (Estes, 1996b)	5
Slika 2-2.	Značilnosti odsekov dvojnovijačne RNA pri rotavirusih (Estes, 1990).	5
Slika 2-3.	Primer elektroforetisa: prerazporeditve genomskih odsekov v celici, okuženi z dvema sevoma (P in Wa) človeških rotavirusov (Ward in sod., 1988b).	11
Slika 3-1.	Shema poteka dela.	22
Slika 3-2.	Skica prileganja notranjih začetnih oligonukleotidov pri reakciji PCR in dolžine pomnoženih odsekov gena G z variabilnimi regijami.	28
Slika 3-3.	Skica prileganja notranjih začetnih oligonukleotidov pri reakciji PCR in dolžine pomnoženih odsekov gena P z variabilnimi regijami.	28
Slika 4-1.	Odseki DNA po RT-PCR za gen G.	31
Slika 4-2.	Odseki DNA po RT-PCR za gen P.	32
Slika 4-3.	Odseki DNA po RT-PCR, komercialni komplet Rotavirus 280.	33
Slika 4-4.	Odseki DNA po vgnezdni PCR reakciji za G genotipizacijo.	34
Slika 4-5.	Odseki DNA po vgnezdni PCR reakciji za P genotipizacijo.	35
Slika 4-6.	Porazdelitev okužb z rotavirusi po starostnih razredih, 1. december 2005 - 7. januar 2006.	36
Slika 4-7.	Število dnevno prevzetih vzorcev pri katerih so z ELISA in EM določili rotaviruse, 1. december 2005 - 7. januar 2006.	36
Slika 5-1.	Pogostost genotipov G, 1. december 2005 – 7. januar 2006.	37
Slika 5-2.	Pogostost genotipov P, 1. december 2005 – 7. januar 2006.	38
Slika 5-3.	Pogostost genotipov, 1. december 2005 – 7. januar 2006.	38

## KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Osnovni podatki vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok in rezultati pomnoževanja odsekov gena G in gena P, genotipizacije, poskusnega komercialnega kompleta Rotavirus 280 in sekvenciranja; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.
- Priloga B:** Pogostost posameznih G in genotipov P; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.
- Priloga C:** Pogostost genotipov; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ag	- antigen, angl.: antigen
AMV	- virus ptičje mieloblastoze, angl.: Avian Myeloblastosis Virus
bp	- bazni par, angl.: base pair
cDNA	- komplementarna DNA, angl.: Complementary DNA
CFU	- angl.: colony forming unit
ddH <sub>2</sub> O	- demineralizirana destilirana voda
DNA	- deoksiribonukleinska kislina, angl.: Deoxyribonucleic Acid
dNTP	- deoksinukleotid trifosfat
ELISA	- encimskoimunski test, angl.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	- elektronska mikroskopija
GSK	- Galaxo Smith Kline
IgM, IgG, IgA	- imunoglobulinska protitelesa razredov M, G in A
MAb	- monoklonska protitelesa, angl.: monoclonal antibody
NSP	- nestrukturni protein, angl.: Non Structural Protein
ORS	- oralna rehidracijska raztopina, angl.: oral rehydration solution
PAGE	- poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCR	- verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo, angl.: polymerase chain reaction
PLG	- gel za ločevanje vodne in organske faze, angl.: Phase Lock Gel
RNA	- ribonukleinska kislina, angl.: Ribonucleic Acid
RT	- obratno prepisovanje, angl.: reverse transcription
RT-PCR	- obratno prepisovanje in verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo, angl.: reverse transcription and polymerase chain reaction
<i>Taq</i>	- <i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tfi</i>	- <i>Thermus filiformis</i>
<i>Tfl</i>	- <i>Thermus flavus</i>
T <sub>m</sub>	- temperatura tališča, angl.: melting point
U	- enote za encimsko aktivnost
VP	- virusni protein, angl.: Viral Protein

## SLOVARČEK

## 1 UVOD

Rotavirusi (rod *Rotavirus*; družina *Reoviridae*) so najpogostejši povzročitelji gastroenteritisa pri novorojenčkih in otrocih po vsem svetu (Parashar in sod., 1998; Steyer in sod., 2005b; Samajdar in sod., 2006). Primeri so lahko sporadični, velikokrat pa se razvijejo epidemije. Okužbe se pojavljajo tako v razvitih kot tudi razvijajočih se deželah (Parashar in Glass, 2003). Izboljšanje sanitarnih razmer za zniževanje obolevnosti za rotavirusne okužbe ne igra ključne vloge (Parashar in sod., 1998; Steyer in sod., 2005a). Virusi se prenašajo fekalno-oralno, z neposrednim stikom okužene osebe in preko okuženih okoljskih površin (Parashar in sod., 1998).

### 1.1 Opredelitev problema

Pri starosti od 3 do 5 let se z rotavirusi skupine A okuži kar 95% otrok (Parashar in sod., 1998). Na podlagi proteinov zunanje plasti kapside (VP4 in VP7) določamo v skupini A serotipe G in P (Parashar in Glass, 2003; Poljšak-Prijatelj in sod., 2005; Steyer in sod., 2005b). Genski zapisi teh proteinov se nahajajo na linearnih odsekih dvojnovijačne RNA (11 odsekov). Prisotnost določenih genotipov v nekem okolju se skozi čas spreminja (Steyer in sod., 2005b), poleg tega pa se vseskozi porajajo novi, katerih nastanek pripisujejo prerazporejanju genoma med različnimi obstoječimi sevi (Samajdar in sod., 2006).

### 1.2 Cilji raziskovanja

Cilj diplomskega dela je bil določiti rotavirusne genotipe iz iztrebkov hospitaliziranih otrok obolelih za gastroenteritisom v Sloveniji v letih 2005/06. Rotaviruse v kužninah so predhodno že dokazali z encimskoimunsko reakcijo (ELISA) in elektronsko mikroskopijo (EM). Želeli smo določiti najpogostejše genotipe ter jih primerjati s tistimi, ki so krožili v Sloveniji v preteklih letih. Poleg tega smo želeli narediti primerjavo genotipov v Sloveniji z genotipi, ki se pojavljajo v sosednjih državah.

Preizkusiti in oceniti smo želeli tudi nov komercialni komplet za kvalitativno določanje prisotnosti rotavirusov v vzorcu Rotavirus 280 (Sacace Biotechnologies).

### 1.3 Delovne hipoteze

Predvidevamo, da

- bomo poleg uveljavljenih genotipov virusov rodu *Rotavirus* določili tudi manj pogoste genotipe v Sloveniji, kajti pogostost genotipov se z leti spreminja.
- bo razširjenost pogostejših genotipov v Sloveniji med rotavirusno sezono 2005/06 v primerjavi s prejšnjimi leti podobna.
- se v sosednjih državah pojavljajo podobni genotipi rotavirusov kot v Sloveniji.
- je komercialni komplet Rotavirus 280 uporaben za hitro diagnostiko.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA

Med mikroorganizme, ki povzročajo gastroenteritise, prištevamo bakterije, parazite in viruse. Prvi odkriti povzročitelji diareje so bili paraziti in bakterije, vendar je ostala večina gastroenteritisev nepojasnjenih (Parashar in Glass, 2003). V letih med 1950 in 1960 so preiskovali tkivne kulture in prvič poročali o virusih v črevesju. V začetku 70. let je velik napredek v virologiji omogočila elektronska mikroskopija, s katero so leta 1972 odkrili prve virusne povzročitelje driske, viruse Norwalk (Kapikian in Chanock, 1990; Parashar in Glass, 2003). Pri preiskovanju duodenalnega epitelija z elektronskim mikroskopom so leto kasneje odkrili okrogle, 70 nm velike viruse. Glede na njihov izgled so jih poimenovali Rotavirus (kolo, lat.: *rota*) (Bishop in sod., 1973). V relativno kratkem času so nato o odkritju rotavirusov v iztrebkih otrok z gastroenteritisom poročali raziskovalci v različnih državah. Kmalu je postalo jasno, da so rotavirusi glavni virusni povzročitelji hude driske pri novorojenčkih in majhnih otrocih povsod po svetu (Kapikian in Chanock, 1990).

### 2.2 KLASIFIKACIJA

Rotaviruse uvrščamo v družino *Reoviridae*, kamor spadajo vsi virusi s segmentirano dvojnovijačno RNA, podobno strukturno karakteristiko in podobnim načinom podvojevanja (Kapikian in Chanock, 1990). Poleg medicinsko pomembnih rodov *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Orbivirus* in *Orthoreovirus* (Koren in sod., 2002) v družino *Reoviridae* spadajo še rodovi *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Saedornavirus*, *Idnoreovirus* in *Oryzavirus* (ICTVdb Management, 2006), ki so jih našli pri živalih ali rastlinah. Za vse rodove je značilna ikozaedrična dvo- ali troslojna kapsida s premerom od 60 do 80 nm. Virusi so brez ovojnice (Koren in sod., 2002; Singelton in Sainsbury, 2001). Rotavirusna kapsida je kompleksna, troslojna in obdaja genom (Parashar in sod., 1998; Ramig, 2004). Rotavirusi se morfološko razlikujejo od ostalih reovirusov saj imajo okrog zunanje plasti kapside kroni podobno strukturo. Če to strukturo izgubijo, jih z elektronsko mikroskopijo ne moremo ločiti od drugih reovirusov (Miller, 1997).

## 2.3 ZGRADBA

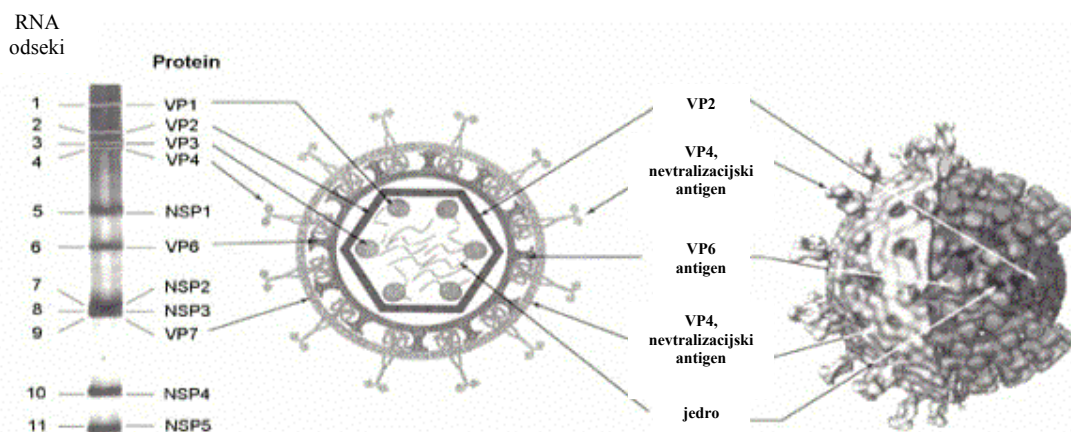
### 2.3.1 Genom

Rotavirusni genom sestavlja 11 odsekov dvojnovijačne RNA. Vsa zaporedja rotavirusnih genov so bogata z A+T baznimi pari (58 – 67 %). Velikosti odsekov se razlikujejo in se gibljejo od 667 do 3302 baznih parov (Estes in Cohen, 1989). Velikosti posameznih odsekov so zapisane v preglednici 2-1. Celoten genom je velik približno 18522 bp (Estes in Cohen, 1989). Razlika v velikosti odsekov se kaže tudi v molekularni masi le-teh in se giblje v območju od  $2 \times 10^5$  do  $2,2 \times 10^6$  Da (Kapikian in Chanock, 1990). Odseke lahko med seboj ločimo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE). Zaradi nastanka sekundarnih struktur ali spremenjenega nukleotidnega zaporedja (Kapikian in Chanock, 1990) se rezultati le-te vedno ne ujemajo z dejanskimi velikostmi odsekov. S primerjavo nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij posameznih odsekov različnih rotavirusnih skupin so ugotovili, da evolucijske spremembe nastajajo z genskim premikom (genska rekombinacija) in genskim odmikom (točkovna mutacija). Poleg tega lahko prihaja do prerazporejanja genomskih odsekov med različnimi sevi človeških rotavirusov (Estes in Cohen, 1989). Opisali so prerazporejanje genomskih odsekov 5, 6, 8, 10 in 11 (po Estes in Cohen, 1989). Allen in Desselberger (1985) sta ugotovila, da je prerazporejanje genoma mogoče tudi med živalskimi in človeškimi sevi rotavirusov.

Preglednica 2-1. Dolžine odsekov RNA in proteini, ki jih določen odsek kodira (Desselberger, 1998: 541).

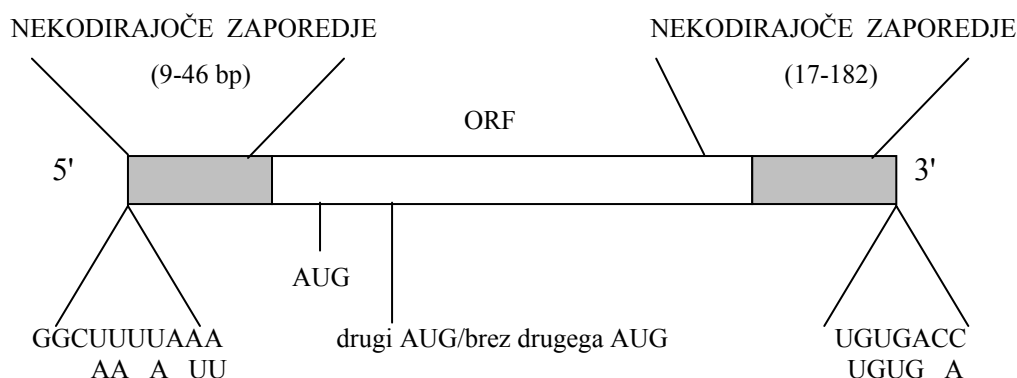
odsek RNA	velikost RNA (bp)	protein, ki ga kodira RNA
1	3302	VP1
2	2687	VP2
3	2591	VP3
4	2362	VP4 (VP5* + VP8*)
5	1581	NSP1
6	1356	VP6
7	1104	NSP2
8	1059	NSP3
9	1062	VP7
10	751	NSP4
11	667	NSP5, NSP6





Slika 2-1. Odseki RNA in proteini, ki jih kodirajo ti odseki (Estes, 1996b).

Vsak RNA odsek se začne s 5' gvanidinskim koncem ohranjenega nekodirajočega zaporedja. Nadaljuje se s kodirajočim zaporedjem, ki se konča z nekodirajočim, le-to pa vsebuje stop kodon in 3' konec, bogat s citidinom (slika 2-2). Večina kodirajočih odsekov (z izjemo odseka 11) ima samo po en odprt bralni okvir. Gen 11 je posebnost, ker ima dva bralna okvirja. Pri vseh genomskih odsekih je najmočnejši prvi začetni kodon AUG, izjeme so odseki 7, 9 in 11. Pri odsekih 7 in 9 je drugi AUG kodon ugodnejši za začetek podvajanja kodirajočega zaporedja. Dolžine 5' in 3' nekodirajočih zaporedij se pri različnih genih razlikujejo. Nekodirajoča zaporedja nosijo zapis za sporočila, ki so pomembna za prepisovanje genov, podvojevanje in verjetno omogočajo kopičenje virusnih genskih odsekov v viroplazmi (Estes in Cohen, 1989).



Slika 2-2. Značilnosti odsekov dvojnovijačne RNA pri rotavirusih (Estes, 1990).

### 2.3.2 Proteini

Rotavirusni geni nosijo zapise za 6 strukturnih (VP) in 6 nestrukturnih proteinov (NSP) (Parashar in sod., 1998; Ramig, 2004). Vsak protein je kodiran na enem izmed 11 odsekov, izjema sta proteina NSP5 in NSP6, ki sta kodirana na istem odseku (odsek 11, bralna okvirja za zapis se prekrivata) (Ramig, 2004). Strukturni proteini so deli viriona, nestrukturni pa nastajajo le v okuženih celicah (Estes in Cohen, 1989). Strukturni proteini so VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 in VP7. VP5\* in VP8\* nastaneta s cepitvijo proteina VP4. Nestrukturni proteini so NSP1 – NSP6. Podatki o molekularni masi, številu aminokislin in približnem deležu proteina v virionu so podani v preglednici 2-2, geni ki jih kodirajo pa v preglednici 2-1 (str. 4) in prikazani na sliki 2-1 (str. 5).

Preglednica 2-2. Molekularna masa, število aminokislin in delež proteina v virionu (Estes in Cohen, 1989).

PROTEIN	MOLEKULSKA MASA (Da)	ŠTEVILO AMINOKISLIN	PRIBLIŽNI DELEŽ PROTEINA V VIRIONU
VP1	124847	1088	2 %
VP2	102431	880	15 %
VP3	98120	835	0,5 %
VP4	86782	776	1,5 %
VP6	44816	397	51 %
VP7	37368, 33919	326, 297	30 %
NSP1	58654	491	ni sestavni del viriona
NSP2	34600	315	ni sestavni del viriona
NSP3	36633	317	ni sestavni del viriona
NSP4	20290	175	ni sestavni del viriona
NSP5, NSP6	21715, ~11000	198	ni sestavni del viriona

Večji del notranje plasti kapside predstavlja protein VP2. Manjši del je sestavljen iz mnogokratnih kopij od RNA odvisne RNA polimeraze VP1 in encima VP3 (metilaza, gvanililtransferaza) (Taraporewala in Patton, 2004; Angel in sod., 2007).

VP6 je glavni strukturni protein, ki sestavlja srednjo plast kapside. Po antigenskih značilnostih in molekularni sestavi tega proteina lahko rotaviruse razdelimo na najmanj 7 seroloških skupin, A-G (Kapikian in Chanock, 1990; Parashar in sod., 1998; Poljšak-Prijatelj in sod., 2005). Pri ljudeh večino okužb povzročijo rotavirusi skupine A, zelo redke so okužbe z rotavirusi skupin B in C (Ramig, 2004; Poljšak-Prijatelj, 2005). Pri živalskih

vrstah lahko okužbo povzročijo vse serološke skupine tega virusa (Ramig, 2004) (preglednica 2-3).

Preglednica 2-3. Kje najdemo rotaviruse določenih skupin (Kapikian in Chanock, 1990).

ROTAVIRUSNA SKUPINA	KJE NAJDEMO TO SKUPINO
A	človek, prašiči, govedo, konji, zajci, mali glodavci, ovce, ptice, ...
B	človek, prašiči, govedo, ovce, podgane
C	človek, prašiči in dihurji
D	perutnina
E	prašiči
F	perutnina
G	perutnina

Skupino A rotavirusov lahko po antigenskih značilnostih proteina VP6 še dodatno razdelimo v najmanj 4 podskupine (I, II, I+II, ne-I in ne-II) (Desselberger in Gray, 2005).

Zunanjo plast kapside sestavljata proteina VP7 in VP4. Glikoprotein VP7 lahko kodirajo genski odseki 7, 8 ali 9 (odvisno od seva). Je glavni nevtralizacijski antigen in omogoča pritrditev virusa na gostiteljsko celico. VP4 je produkt genskega odseka 4. Neglikoziliran protein je zasidran v zunanjo plast kapside in sestavlja štrleče izrastke, ki segajo izven nje. Tripsina ga cepi na dva dela, VP5\* (molekulska masa je približno 60000 Da) in VP8\* (molekulska masa je približno 28000 Da). Ta cepitev vpliva na virusno infektivnost, saj omogoči vstop v celice. Pomembna lastnost proteina VP4 je tudi sposobnost hemaglutinacije (Kapikian in Chanock, 1990; Parashar in sod., 1998). Glede na epitope ali sekvenčno variabilnost proteinov zunanje kapside so za skupino A rotavirusov osnovali tudi klasifikacijski sistem, ki razlikuje G (VP7 specifični) in P (VP4 specifični) serotipe in genotipe (Desselberger in Gray, 2005).

NSP proteini sodelujejo pri pomnoževanju virusnega genoma in pravilnem pakiranju tega v virion. NSP1, NSP2, NSP3 in NSP5 imajo afiniteto za vezavo na RNA (Kapikian in Chanock, 1990). NSP6 protein ima vlogo vezave na NSP5. Predvidevajo, da prav tako kot ostali pomaga pri pomnoževanju in pakiranju genoma, vendar nekatere vrste sevov skupine

A in rotavirusi skupine C, proteina NSP6 ne kodirajo (Torres-Vega, 2000). Nestrukturni protein NSP4 deluje kot enterotoksin, vendar povzroča drisko z drugimi mehanizmi kot bakterijski enterotoksini (Lundgren in Svensson, 2001; Lorrot in Vasseur, 2007). Enterotoksin NSP4 ne povzroča morfoloških poškodb na celicah, prav tako ne vpliva na izločanje klorovih ionov iz celic kript. Zmanjša absorpcijo D-glukoze in poveča absorpcijo klorovih ionov na nivoju celic črevesnih resic (Lorrot in Vasseur, 2007). Pomembna vloga NSP4 je tudi uravnavanje transporta kalcijevih ionov v okuženi celici (povečanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  v celici) (Estes, 1996a).

## 2.4 RAZMNOŽEVANJE IN PATOGENEZA

Rotavirusi se razmnožujejo v zrelih epitelijskih celicah resic tankega črevesa. Virusi se pritrdijo na specifičen receptor in vstopijo v notranjost celice. V lizosomu poteka slačenje zunanje kapside (izguba VP7 in VP4) s pomočjo celičnih encimov ter prepisovanje RNA z od RNA odvisno RNA polimerazo (VP1). Pozitivni prepisi verig RNA se premestijo izven virusnih delcev v citoplazmo celice, kjer se prevedejo v primarne genske produkte (strukturne in nestrukturne proteine) in delujejo kot matrice za sintezo genskih odsekov dvojnovijačne RNA. V viroplazmi se genski odseki začno pakirati v sloj kapside iz proteinov VP1, VP2 in VP3. Na poti iz celice nezreli virusi pridobijo še ostale sloje kapside, začasno pa pridobijo tudi ovojnico, ki kmalu razpade. Zreli virusi se s citolizo sprostijo iz celice (Silvestri in sod., 2004).

Pomnoževanje rotavirusov je hitro in dosega visoke titre v zelo kratkem času (do  $10^{11}$  virusov /ml iztrebka v času najhujše driske). Driska je posledica nekroze in atrofije epitelijskega, zmanjša se absorpcija ogljikovih hidratov in poveča osmotski pritisk v lumnu črevesja. Enterotoksin NSP4 še dodatno onemogoča normalno delovanje črevesnih celic (Desselberger, 1999; Lundgren in Svensson, 2001).

Novorojenčki in majhni otroci se velikokrat okužijo z rotavirusi v prvih letih življenja. Protitelesa matere se prenesejo preko placente na plod in imajo zaščitno vlogo prvih nekaj mesecev življenja novorojenca (Parashar in sod., 1998). Prvotna rotavirusna okužba vodi

do za serotip specifičnega humoralnega imunskega odziva, kateri sledi monotipska zaščita. V obdobju prvih dveh let življenja se otroci okužijo z različnimi tipi rotavirusov, kar omogoča kompleksnejši imunski odgovor in s tem delno heterotipsko zaščito. Po prepoznavanju rotavirusnih antigenov (VP4 in VP7) začno T-celice proizvajati za sev specifična zaščitna protitelesa razredov IgM in IgG. Največji del zaščite pa omogočajo predvsem sekretorna protitelesa razreda IgA, ki se ob okužbi izločajo iz črevesne sluznice (Desselberger in Gray, 2005; Angel in sod., 2007).

## 2.5 KLINIČNE ZNAČILNOSTI

Po okužbi in 1-2 dneh inkubacijske dobe nastopi akutni virusni gastroenteritis. Značilni znaki so vodena driska (Staat, 2005), ki lahko traja 4-7 dni, bljuvanje in dehidracija. Okužbo lahko spremljajo trebušni krči, glavobol in bolečine v mišicah. Izid okužbe je odvisen od virusnih dejavnikov patogenosti in gostiteljevega imunskega sistema. Kljub temu, da rotavirusne okužbe poleg driske pogosto spremljajo respiratorni klinični znaki, ni dokazov o tem, da bi se rotavirusi lahko razmnoževali v celicah respiratornega trakta (Desselberger in Gray, 2005). Načeloma se razmnožujejo le v celicah črevesnega epitela, kljub temu pa poročajo o posameznih primerih razširjanja rotavirusov izven črevesja. Virus so našli v jetrih (Carlson, 1978), žolčnih vodih (Riepenhoff-Talty, 1996), centralnem živčnem sistemu (Lynch, 2001), srčni mišici (Cioc, 2002) in trebušni slinavki (Coulson, 2002), zabeležili so tudi viremije, redkeje encefalopatije (Desselberger in Gray, 2005). Leta 2006 so pri bolnici z akutnim encefalitisom in gastroenteritisom odkrili rotaviruse skupine A genotipa G3 v cerebrospinalni tekočini in iztrebku. Taki bolniki naj bi ozdraveli brez posledic, v redkih primerih pa bi lahko prišlo do nevroloških sprememb (Furuya, 2007). Kronične okužbe niso značilne, zabeležili so jih le pri imunsko oslabljenih otrocih (Desselberger in Gray, 2005).

Okužbe z rotavirusi lahko potekajo tudi brez bolezenskih znakov (Parashar in sod., 1998). V primeru, da se bolezenski znaki pojavijo, je potrebno zdravljenje, sicer lahko pride do hujše dehidracije in celo smrti (Parashar in sod., 2003).

## 2.6 ZDRAVLJENJE

Zdravljenje rotavirusnih okužb temelji na nadomeščanju izgubljene vode in elektrolitov. Najpogosteje se uporablja oralna rehidracijska raztopina (angl.: ORS), ki jo priporoča svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organisation). ORS vsebuje izotonično raztopino soli z dodano glukozo. V hujših primerih driske z bljuvanjem je nujna intravenozna rehidracija (Desselberger, 1999). Odkrili so, da dodatek  $5 \times 10^9$  CFU (colony forming units) bakterije *Lactobacillus* (sev GG) ali drugih mlečnokislinskih bakterij v ORS skrajša trajanje driske (Majamaa in sod., 1995). Preizkušajo tudi protivirusna zdravila, zaviralce proteaz (tripsina) in nukleozidne analoge, ki naj bi zmanjšala infektivnost rotavirusov ali ohromila njihovo razmnoževanje (Desselberger, 1999).

## 2.7 DIAGNOSTIKA

### 2.7.1 ELISA (encimskoimunski test, angl.: enzyme-linked immunosorbent assay)

Za dokazovanje rotavirusov se najpogosteje uporablja neposredni encimskoimunski test, ki je visoko specifična in občutljiva metoda (1 ng virusnega antigena/1 ml kužnine). S komercialnim kompletom ELISA določamo le rotaviruse skupine A, ne pa tudi skupin B in C. Z encimskoimunsko metodo dokazujemo antigen VP6 (Sinleton in Sainsbury, 2001; Koren, 2002; Madigan in sod., 2003)..

### 2.7.2 Elektronska mikroskopija (negativno kontrastiranje)

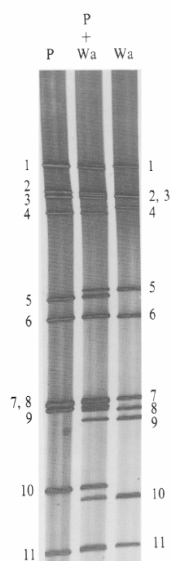
Elektronska mikroskopija (EM) z negativnim kontrastiranjem omogoča natančno neposredno opazovanje virusov in njihove zgradbe. Z EM lahko določimo rotaviruse skupin A, B ali C, kar pa s komercialnim kompletom ELISA ni mogoče (namenjena za zaznavanje rotavirusov skupine A). Z EM lahko dokazujemo viruse, katerih gojenje v tkivnih kulturah ni mogoče. Potrebna je predhodna obdelava vzorca iztrebka in negativno kontrastiranje s kontrastnim sredstvom, ki vsebuje elemente težke kovine (npr. fosforvolframova kislina). Diagnostika s to metodo je hitra. Slabost metode je nizka

občutljivost, saj je potrebna koncentracija za dokaz virusov v kužnini  $10^7$  virusov/ml (Miller, 1997; Sinleton in Sainsbury, 2001; Koren, 2002; Madigan in sod., 2003).

### 2.7.3 PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza) in PCR (verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo)

Metodi PAGE in PCR se uporabljata za dokazovanje virusnega genoma in v epidemioloških raziskavah.

PAGE ali poliakrilamidna gelska elektroforeza je metoda s katero razlikujemo ločitvene vzorce odsekov RNA različnih rotavirusnih sevov glede njihove mobilnosti v poliakrilamidnem gelu (Ward in sod., 1988b). Ločimo kratki in dolgi elektroforetip, ki se razlikujeta v hitrosti potovanja odsekov 10 in 11 (Kapikian in Chanock, 1990).



Slika 2-3. Primer elektroforetipa: prerazporeditve genomskih odsekov v celici, okuženi z dvema sevoma (P in Wa) človeških rotavirusov (Ward in sod., 1988b).

Metoda PCR je natančneje opisana v poglavju 3.2. Danes je ena najpogosteje uporabljenih metod za določanje genotipov G in P. Zaradi pomanjkljivosti PCR so začeli uporabljati mikromreže (poglavje 5.3).

## 2.8 EPIDEMIOLOGIJA

### 2.8.1 Obolevnost in smrtnost

Rotavirusi skupine A so najpogostejši povzročitelji driske pri novorojenčkih in otrocih po vsem svetu (Kapikian in Chanock, 1990; Parashar in sod., 1998; Steyer in sod., 2005b, Samajdar in sod., 2006). Z njimi se okuži skoraj vsak otrok do petega leta starosti (95 %) (Parashar, 1998; Ramig, 2004). Okužbe z rotavirusi so značilne tudi za mladiče številnih sesalcev in ptic (Ramig, 2004).

Rotavirusne okužbe so pogoste v razvitih kot tudi razvijajočih se deželah, kar nakazuje, da omejitev razširjanja ni pogojena z izboljšanjem kakovosti pitne vode, higiene in zdravstvene oskrbe. V preiskavi od leta 1986 do 2000 so ocenili, da vsako leto rotavirusne okužbe prizadenejo povprečno 111 milijonov otrok, ki potrebujejo nego na domu, 2 milijona otrok je potrebno hospitalizirati. Vsako leto umre od 352000 do 592000 otrok, starih do 5 let (Parashar in sod., 2003; Ramig, 2004). V letu 2006 so Parashar in sodelavci poročali o srednji vrednosti ~611000 (od 454000 do 705000) smrti otrok na leto, pretežno v razvijajočih se deželah. Večja smrtnost v razvijajočih se deželah je posledica slabših socialnoekonomskih razmer, zdravstvene oskrbe in podhranjenosti. Zaradi okužb z rotavirusi na teh področjih umre okoli 82% otrok. Nasprotno pa se je smrtnost nekoliko zmanjšala v razvitih deželah. Tu izpostavljajo problem stroškov oskrbe hospitaliziranih otrok. Dlje kot je bolnik v bolnici, večje denarno breme predstavlja, hkrati pa je rezervoar, ki lahko povzroči dodatne primere bolnišničnih okužb, ki zopet povečajo stroške. Prav zaradi teh razlogov je nujno potreben razvoj cepiva, ki bi preprečilo hude oblike bolezni in nenazadnje smrt zaradi nje (Parashar in sod., 2003; Chandran in sod., 2006).

Z rotavirusi skupine A se lahko okužijo tudi odrasli, navadno starši obolelih otrok, vendar se pri njih le redko razvije driska. Bolezenski znaki so pogostejši pri odraslih, ki imajo oslabljen imunski sistem (okuženi s HIV in starejši ljudje) in tistih, ki potujejo po deželah v razvoju (Parashar in sod., 1998).

Prav tako kot rotavirusna skupina A povzročajo drisko pri ljudeh tudi virusi skupin B in C. Skupina B povzroča izbruhe akutnega gastroenteritisa pri otrocih in odraslih. Izbruhe so



zabeležili na Kitajskem v osemdesetih letih dvajsetega stoletja, nedavno tudi v Kalkuti, Indiji in drugih jugovzhodnih azijskih deželah. Rotavirusna skupina C rotavirusov se pri ljudeh pojavlja sporadično ali kot manjši izbruhi (Desselberger in Gray, 2005). O pojavu rotavirusov skupine C v Sloveniji so prvič poročali v letu 2006. Okužena sta bila dva starejša otroka in ena odrasla oseba (Steyer A., 2006).

## **2.8.2 Prenos in preventiva**

Prevladujoči način prenosa rotavirusnih okužb je fekalno-oralen. Prenos je mogoč z medosebnim stikom, z respiratornimi izločki in okuženimi površinami (Parashar, 1998). Rotavirus na dlaneh preživi najmanj 4 ure, zaskrbljujoče pa je, da niti umivanje rok z milom ni dovolj učinkovito za popolno uničenje ali odstranitev virusa (Ansari in sod., 1988; Ansari in sod., 1989; Lužnik Bufon in sod., 1999). Na okuženih površinah naj bi preživel tudi več dni (npr.: igrače, kljuge vrat, postelje,...). Ta dejstva pojasnjujejo razširjanje okužb preko velikih geografskih površin (Parashar, 1998). Za okužbo, ki povzroči bolezenske znake, je potrebno relativno majhno število virusov (Desselberger, 1999). Prenos z živali na človeka ni značilen. Živalski sevi rotavirusov se razlikujejo od tistih, ki okužijo človeka, vendar pa so odkrili, da imajo nekateri človeški sevi visoko stopnjo genetske homologije z živalskimi (Nakagomi in Nakagomi, 1991).

Učinkovita sredstva za razkuževanje površin vsebujejo kvartarne amonijeve spojine v kombinaciji s 40% (ali več) alkoholom in 10% klorovodikovo kislino (Desselberger, 1999). Za preprečevanje širjenja rotavirusnih okužb je pomembno, da se ob obisku bolnega otroka izogibamo stiku z drugimi bolniki (Rao, 1995). Ugotovili so, da nekatere vrste lateks rokavic prepuščajo rotaviruse (tudi druge viruse do velikosti 90 nm), zato je kljub njihovi uporabi potrebno umivanje in razkuževanje rok (Lužnik Bufon in sod., 1999). Z uporabo 70% izopropanola ali 70% etanola so dokazali več kot 99% zmanjšanje števila rotavirusov na dlaneh (Ansari in sod., 1989; Lužnik Bufon in sod., 1999). Preventiven ukrep je tudi cepljenje otrok (poglavje 2.9).

### 2.8.3 Sezonsko porajanje epidemij

Rotavirusne okužbe se pojavljajo sezonsko (Parashar in sod., 1998). V območju zmerno toplega pasu se rotavirusne okužbe pojavljajo predvsem pozno jeseni, pozimi in zgodaj spomladi, v tropskih in subtropskih pokrajinah pa skozi vse leto (Desselberger in Gray, 2005). Sezonsko nihanje okužb prav tako ni značilno v deželah v razvoju (Cook in sod., 1990). Glede na podatke Inštituta za varovanje zdravja (IVZ) od leta 1998 do 2006 je tudi v Sloveniji zaznati sezonsko nihanje (Preglednica 2-4).

Preglednica 2-4. Rotavirusne okužbe v Sloveniji od leta 1998, po mesecih (Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, 2006b).

LETO/MESEC	JAN	FEB	MAR	APR	MAJ	JUN	JUL	AVG	SEP	OKT	NOV	DEC	SKUPAJ
1998	68	101	112	163	123	98	39	47	28	69	147	199	1194
1999	234	98	80	70	41	24	18	40	29	52	68	137	891
2000	202	187	226	134	77	166	117	81	68	46	22	54	1380
2001	69	67	149	180	163	100	65	132	109	172	145	460	1811
2002	650	279	201	192	115	78	65	45	129	68	79	133	2034
2003	217	250	237	246	189	71	77	86	126	121	139	177	1936
2004	303	264	294	182	97	69	56	76	52	83	143	200	1819
2005	231	136	150	231	99	47	54	83	52	125	119	377	1704
2006	588	417	234	110	74	62	73	101	46	23	41	53	1822

### 2.8.4 Evolucijski mehanizmi

Epidemiologija rotavirusov je zelo kompleksna, saj se ob kateremkoli času in na kateremkoli geografskem območju lahko širijo rotavirusi različnih genotipov G in P, različnih G/P kombinacij (Gentsch in sod., 1996). Osnova za veliko raznolikost je predvsem genska dispozicija virusa. Kot že omenjeno sta pri rotavirusih skupine A glavna evolucijska mehanizma genski odmik (točkovna mutacija, angl. drift) in genski premik (genska rekombinacija in prerazporejanje genoma, angl. shift). Proteina G in P sta kodirana na različnih odsekih RNA, zato se zaradi prerazporejanja pojavljajo različne kombinacije genotipov G in P (Desselberger in Gray, 2005). Teoretično bi lahko s prerazporejanjem genoma nastalo  $2^{11}$  virusov z novimi lastnostmi (Ramig, 1997). Med razmnoževanjem dveh rotavirusnih sevov v eni celici lahko nastanejo tudi tako imenovani mozaiki (virioni s proteini kapside obeh sevov) in psevdotipi (virioni katerih geni izvirajo iz prvega seva,

proteini kapside pa so od drugega) (Ward in sod., 1988a, Ward in sod., 1988b). Poleg zmožnosti prerazporejanja genoma med človeškimi rotavirusi so dokazali tudi prerazporejanje genomskih odsekov med človeškimi in živalskimi rotavirusnimi sevi (Desselberger in sod., 2006; Matthijnsens in sod., 2006).

## **2.8.5 Molekularna epidemiologija**

### **2.8.5.1 Svet in Evropa**

Ko so raziskali pogostost rotavirusnih genotipov v Evropi v zadnjih 10.-15. letih, so ugotovili, da so najpogostejši genotipi G1, G3, G4 v kombinaciji s P[8] in G2 v kombinaciji s P[4]. Tip G2 so določili le občasno. Leta 1996 se je v Evropi pojavil genotip G9 v kombinacijah s P[8] in P[6]. Vedno pogosteje se pojavljajo tudi neobičajni genotipi G1P[4], G2P[8], G6P[9] in drugi (Desselberger in sod., 2006).

Raznolikost določenih rotavirusnih genotipov v Evropi je podobna tisti v severni Ameriki, Avstraliji in Novi Zelandiji, vendar se močno razlikuje od tiste iz tropskih in subtropskih območij. Vsaj 90 % rotavirusnih okužb v Evropi, severni Ameriki in Avstraliji povzročajo kombinacije genotipov G1P[8], G2P[4], G3P[8] in G4P[8]. Te genotipe so v Južni Ameriki ter Aziji določili le v 68 % in samo v 50 % v Afriki (Desselberger in sod., 2006).

### **2.8.5.2 Slovenija**

V obdobju od leta 1988 do 1994 so v Sloveniji krožili genotipi G1P[8], G3P[8], G3P[9] in G4P[8], prevladovala sta genotipa G4P[8] (45,2 %) in G1P[8] (17,8 %). Poleg teh so zabeležili tudi tri mešane okužbe z genotipi G3G4P[8]P[9], G3P[8]P[9] in G1G4P[8]. V letih 1999 do 2001 pa so dokazali le genotip G1P[8]. V letu 2001 so v Sloveniji prvič odkrili genotip G9P[8]. Od leta 2000 do 2003 je bil najbolj pogost genotip G1P[8], drugi najpogostejši pa genotip G4P[8] (Steyer, 2002; Steyer in sod., 2005a; Steyer in sod., 2005b).

### 2.8.5.3 Hrvaška, Avstrija, Madžarska in Italija

Na Hrvaškem sta leta 2005/06 prevladovala genotipa G1P[8] in G2P[4], sledil jima je tip G4P[8], v manjši meri pa so se pojavljali genotipi G3P[8], G9P[8], G8P[8], G2P[8], G1P[4] in G4P[4]. Dokazali so še genotipa G9P[4] in G10P[6], vsakega le v enem od 459 preiskanih vzorcev (Tcheremenskaia in sod., 2007).

V letih 1992-2000 so na Madžarskem določili pogostejše genotipe G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] in G2P[4]. Poleg teh so določili tudi nenavadne genotipe kot so G4P[6], G3P[9], G6P[9] in G6P[14]. Med leti 2000-2003 so v raziskavi, ki je vključevala hospitalizirane otroke v Budimpešti, določili dva prevladujoča genotipa G1P[8] in G9P[8] ter genotipe, ki so se pojavljali v manjšem številu: G4P[8], G2P[4], G3P[8], G3P[9], G4P[6], G6P[9] in G1P[4]. (Bányai in sod., 2004a; Bányai in sod., 2004b; Bányai in sod., 2004c; Bányai in sod., 2005).

V Avstrijski raziskavi med leti 1997 in 1998 so dokazali le tri različne genotipe. Najpogosteje so določili genotip G1P[8], v manjši meri pa genotipa G4P[8] in G3P[8]. Kar v 12,0 % vzorcev z metodo RT-PCR niso uspeli dokazati rotavirusne RNA (Frühwirth, 2000).

V Italiji so do leta 1999 genotipi G1-G4 predstavljali 90 % okužb (Arista, 1997). V letih 2001-2005 sta prevladovala genotipa G1 in G9. Nekaj manj je bilo genotipov G4 in G3. Genotipi G1, G3, G4 in G9 so se pojavljali v kombinaciji z genotipom P[8]. Le pri 4,4 % vzorcev so določili genotip G2P[4]. Dokazali so dve nenavadni G/P kombinaciji, G1P[6] in G9P[9] (De Grazia in sod., 2007).

## 2.9 CEPIVA

Začetki razvoja cepiv segajo v srednja 70. leta prejšnjega stoletja. Prva cepiva so bila monovalentna, pripravljena iz živalskih rotavirusov. Ker ta cepiva niso bila učinkovita so razvili prvo multivalentno živo oralno cepivo, v katero so vključili 4 virusne seve

genotipov G1 do G4. Cepivo so leta 1998 odobrili za uporabo pri otrocih v Združenih državah Amerike. Komaj 9 mesecev kasneje so cepivo umaknili s tržišča, saj so poročali o povezavi cepiva z uvihavanjem črevesja pri otrocih (Dennehy, 2007).

Danes sta na tržišču 2 cepivi: RotaTeq (Merck) in Rotarix (GSK). RotaTeq je živo oslajljeno oralno petvalentno cepivo, ki vsebuje goveji rotavirusni sev WC3 kot osnovo, gena za VP7 in VP4 pa izvirata iz človeških rotavirusov (7 nevtralizirajočih determinant: 2 antigena živalskih rotavirusov in antigeni humanih rotavirusov za tipe G1, G2, G3, G4 in P[8]). Učinkovitost cepiva je 98%. Uporabo cepiva so februarja 2006 odobrili v ZDA, novembra 2006 pa tudi v Evropi in Latinski Ameriki. Načrt cepljenja predvideva tri odmerke in sicer pri 2, 4 in 6 mesecih starosti otroka. Rotarix je živo oslajljeno cepivo s človeškim rotavirusnim sevom, izoliranim iz naravno okuženega otroka z virusnim gastroenteritisom (genotip G1P[8]). Cepivo je učinkovito v 85 %. Rotarix so prvič odobrili v Mehiki in Dominikanski republiki leta 2004, novembra 2006 pa so cepivo odobrile tudi nekatere evropske države, nekatere države Latinske Amerike, Afrike in Azije. Cepivo se je izkazalo za varno, imunogeno in učinkovito. Kljub temu, da sta se ti dve cepivi izkazali za varni ter učinkoviti in sta pridobili dovoljenje za uporabo, še vedno ne vedo, kako sprožita zaščito. Ocenjevanje novih rotavirusnih cepiv je trenutno mogoče praktično izvesti le z velikimi in dragimi kliničnimi poskusi. Ker cepiva niso dolgo na tržišču, še vedno ne vedo, kakšen vpliv bodo imela na smrtnost in epidemiologijo v prihodnosti. Zaradi različne zastopanosti posameznih sevov na različnih geografskih območjih je vprašljivo delovanje teh dveh cepiv (Angel in sod., 2007; Dennehy, 2007).

V Sloveniji cepljenje otrok ni obvezno, odločitev je prepuščena staršem otrok. Cepivo Rotarix je v uporabi od oktobra 2006, za zaščito sta potrebna 2 odmerka pred dopolnjenim 24 tednom starosti (Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, 2006a).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Materiali in vzorci za osamitev RNA s Trizolom

- Pozitivni vzorci iztrebkov hospitaliziranih otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom
- Trizol (Invitrogen)
- Kloroform (Merck)
- 2-propanol (Merck)
- 75% etanol, pripravljen iz absolutnega etanola (Merck)
- Demineralizirana in destilirana (ddH<sub>2</sub>O) sterilna voda brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- Epruvete PLG (1,5 ml, Phase lock gel, Quiagen)

##### 3.1.2 Reagenti za reakcijo PCR

###### 3.1.2.1 Komercialni komplet Access RT-PCR Core Reagents (Promega) - reagenti za reakcijo RT-PCR

- ddH<sub>2</sub>O brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- 5x AMV/*Tfi* reakcijski pufer (Promega)
- Mešanica dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), koncentracija 10 mM (Promega)
- Začetni oligonukleotidi: Beg9 in End9 za pomnoževanje gena G (Gouvea in sod., 1990) ter con2 in con3 za pomnoževanje gena P (Gentsch in sod., 1992)
- MgSO<sub>4</sub>, koncentracija 25 mM (Promega)
- AMV reverzna transkriptaza, koncentracija 5 U/μl (Promega)
- *Tfi* DNA polimeraza, koncentracija 5 U/μl (Promega)

### 3.1.2.2 Komercialni komplet Rotavirus 280 (Sacace Biotechnologie) - reagenti za reakciji RT in PCR

Rotavirus 280 komercialni komplet je sestavljen iz dveh delov:

- 1) Reverta-R (vsebuje reagente za 60 testiranj):
  - liofiliziran DDT v 5 epicah
  - RT-mix (že pripravljena mešanica za reverzno transkripcijo, 0,125 ml)
  - Reverzna transkriptaza (M-MLV, 0,03 ml)
  - TE-pufer (1,0 ml)
  
- 2) Rotavirus 50R (vsebuje reagente za 55 testiranj):
  - PCR-mix-1 (55 testnih epic z mešanico za PCR, pripravljenih za enkratno uporabo)
  - PCR-mix-2 (mešanica za PCR, 0,6 ml)
  - Mineralno olje (2,0 ml)
  - Rotavirus cDNA (C+, 0,1 ml)
  - DNA-pufer (C-, 0,5 ml)
  - Negativna kontrola (C-, 1,6 ml)

### 3.1.2.3 Reagenti za reakcijo PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (vgnezdena PCR)

#### 3.1.2.3.1 *Go Taq DNA polimeraza*

- ddH<sub>2</sub>O brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- 10x puferska raztopina z dodanim MgCl<sub>2</sub> (Promega)
- Mešanica dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), koncentracija 10 mM (Promega)
- Notranji začetni oligonukleotidi: aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8, aFT9 in End9 za določanje genotipa G ter 1T-1A, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1, SE-1 in con3 za določanje genotipa P
- Go Taq DNA polimeraza, koncentracija 5 U/μl (Promega)

### 3.1.2.3.2 *Tfi* DNA polimeraza

- ddH<sub>2</sub>O brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- 5x puferska raztopina (Invitrogen)
- Mešanica dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), koncentracija 2 mM (Invitrogen)
- Notranji začetni oligonukleotidi: 1T-1A in con3 za določanje genotipa P[8]
- MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM
- *Tfi* DNA polimeraza 5 U/μl (Invitrogen)

### 3.1.3 Material za analizo produkta PCR

- agarosa (Promega, Invitrogen)
- 1x TAE puferska raztopina; Za pripravo 50x raztopine TAE potrebujemo 242,0 g Tris baze in 37,2 g EDTA, katerima dodamo destilirano vodo do skupnega volumna 850 ml ter reagente raztopimo. Dodamo še 57,0 g očetne kisline, ki uravna pH vrednost na 8,5 in prilijemo vodo do 1000 ml. Nato redčimo 50x TAE raztopino tako, da dobimo 1x TAE pufersko raztopino (10 ml 50x TAE dodamo 490 ml destilirane vode).
- Etidijev bromid; Za pripravo koncentracije 50 mg/ml potrebujemo 500 mg Etidijevega bromida in 10 ml vode. Koncentracija delovne raztopine je 5 mg/ml, zato izhodno koncentracijo 10x redčimo v 1x TAE puferski raztopini.
- 6x nanašalni pufer;

### 3.1.4 Laboratorijska oprema in aparature

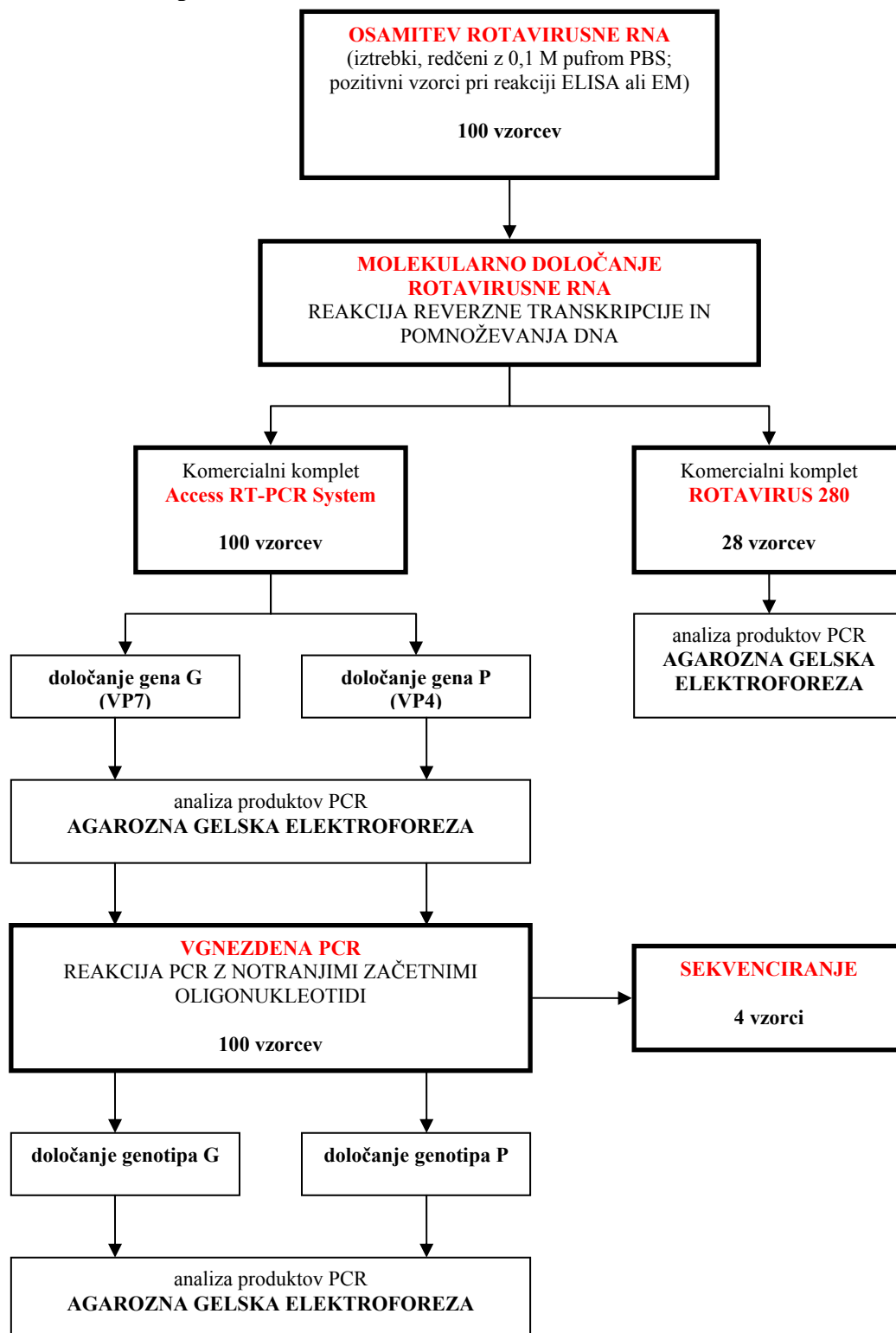
- zaščitne rokavice brez smukca (Safeskin)
- zaščitni komori (Iskra PIO, LFV 9)
- 70% etanol za razkuževanje površin
- staničevina
- mešalo vorteks (Tehtnica Železniki)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415R)
- ultracentrifuga (Beckman)



- avtomatske pipete z območji pipetiranja 0.5-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l, 10-1000  $\mu$ l (Eppendorf)
- nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- plastične epruvete velikosti 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml in 2,0 ml (Eppendorf)
- stojala za epruvete (Eppendorf)
- merilni valj
- erlenmajerice
- tehtnica (Sartorius)
- mikrovalovna pečica (Miele)
- napajalnik za elektroforezo (LKB Bromma)
- banjica za elektroforezo (Biometra)
- UV transiluminator (LKB)
- kamera za snemanje agaroznih gelov (BIO-RAD Gel doc 2000)
- računalniški program (Quantity One, BIO-RAD)
- termopomnoževalnika (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700)

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Shema poteka dela



Slika 3-1. Shema poteka dela.

### **3.2.2 Osamitev RNA**

RNA smo osamili iz vzorcev iztrebkov, razredčenih z 0,1 M pufrom PBS, shranjenih v zamrzovalniku pri -20°C. Postopek osamitve smo izvedli v brezprašni komori. Za vsak vzorec posebej smo pripravili PLG epruvetke in jih označili z zaporedno številko vzorca kot na protokolnem listu. PLG epruvetke smo kratko centrifugirali 20 do 30 sekund pri 14000 obratih na minuto. Vzorce smo odtajali in jih premešali na mešalu. V 1,5 ml sterilne epruvetke smo zmešali 250 µl vzorca in 750 µl Trizola ter dobro suspendirali s pipetiranjem. Mešanico smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, nato smo dodali še 200 µl kloroforma, dobro zaprli epruvetke in premešali. Vsebino smo prenesli v epruvetke PLG ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je 5 minutno centrifugiranje pri 14000 obratih na minuto. PLG tvori mejo med vodno in organsko fazo. Zgornjo, vodno fazo z RNA smo prenesli v novo epruvetko, dodali 500 µl izopropanola, dobro premešali, inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi in centrifugirali 10 minut pri 13200 obratih na minuto. Odlili smo supernatant, RNA sprali z 0,5 ml 75% etanola (-20°C) ter centrifugirali 5 minut pri 13200 obratih na minuto. Ponovno smo odlili supernatant in RNA posušili na zraku v komori za sterilno delo pri maksimalnem pretoku zraka (cca 30 minut). Na koncu smo RNA raztopili v 30 µl ddH<sub>2</sub>O brez RNaz. Osamljeno RNA smo shranili na -70°C.

### **3.2.3 Molekularno določanje rotavirusne RNA z enostopenjsko reakcijo reverzne transkripcije in pomnoževanja DNA (RT-PCR)**

Za RT-PCR smo uporabili komercialni komplet Access RT-PCR (Promega). Namenjen je za enostopenjsko reakcijo reverzne transkripcije in pomnoževanja DNA. S kompletom Access RT-PCR smo pomnožili specifične tarče rotavirusnih odsekov RNA za nadaljnje določanje genotipov G in P. Za vsak vzorec smo morali pripraviti reakcijsko mešanico (preglednica 3-1) s 50 µl končnega volumna. Znane smo imeli začetne in končne koncentracije reagentov. Na podlagi teh podatkov smo izračunali koliko posameznega reagenta moramo dodati v vsako epruvetko.

Preglednica 3-1. Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR s komercialnim kompletom Access RT-PCR System.

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen, dodan v reakcijsko mešanico ( $\mu$ l)
ddH <sub>2</sub> O			31
5x AMV/ <i>Tfl</i> pufer		1x	10
Mešanica dNTP	10 mM	0,2 mM	1
Začetni oligonukleotid 1	20 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	1
Začetni oligonukleotid 2	20 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	1
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	1 mM	2
AMV reverzna transkriptaza	5 U/ $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l	1
<i>Tfl</i> DNA polimeraza	5 U/ $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l	1
Vzorec osamljene RNA			2
Končni volumen reakcije			50

Z RT-PCR smo pomnoževali specifičen odsek rotavirusnega genoma. Za dokazovanje rotavirusov skupine A smo uporabili začetne oligonukleotide, ki omogočajo pomnoževanje celotnega odseka gena G (nosi zapis za strukturni protein VP7) in pomnoževanje odseka gena P (nosi zapis za strukturni protein VP4). Za pomnoževanje gena G smo uporabili začetna oligonukleotida Beg9 in End9, za gen P pa začetna oligonukleotida con2 in con3 (preglednica 3-2). Za pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec 801/06, negativna kontrola pa je bila ddH<sub>2</sub>O brez RNAz.

Preglednica 3-2. Pomembne značilnosti začetnih oligonukleotidov Beg9, End9, con2 in con3.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	Mesto prileganja	T <sub>m</sub> (°C)
Beg9	GCTTTAAAAGAGAGAATTTCCG	2-23	60
End9	GGTCACATCATACAATTCTAAT	1061-1031	58
con2	ATTTCGGACCATTTATAACC	868-887	54
con3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11-32	62

Najprej smo v termopomnoževalniku iz RNA sintetizirali cDNA in nato DNA pomnoževali (preglednica 3-3). Rezultate smo preverili z gelsko elektroforezo (2% agarozni gel). Dolžina pomnoženih produktov gena G mora biti 1061 bp, gena P pa 876 bp.

Preglednica 3-3. Program RT-PCR za pomnoževanje gena G in gena P (komercialni komplet Access RT-PCR System).

Proces	Temperatura/(°C)		Čas/(min)	Število ciklov
	za gen G	za gen P		
Reverzna transkripcija	45	45	45	1
Razdvajanje in inaktivacija RT	94	94	2	1
Razdvajanje	94	94	0,5	40
Vezava začetnih oligonukleotidov	56	50	1	
Podaljševanje	68	68	2	
Končno podaljševanje	68	68	7	1

### 3.2.4 Molekularno določanje rotavirusne RNA z reverzno transkripcijo in pomnoževanjem DNA

Komercialni komplet Rotavirus 280 (Sacace Biotechnologies) je namenjen za kvalitativno določanje rotavirusne RNA, reverzna transkripcija in pomnoževanje DNA sta ločeni reakciji.

Za 12 reakcij smo v epruvetko z liofiliziranim DTT odpipetirali 125 µl RT-mešanice, vorteksirali 10 sekund in dodali 6 µl M-MLV (reverzna transkriptaza), ponovno vorteksirali 3 sekunde in centrifugirali 7 sekund. V 12 epruvetk (0,5 µl) smo nato odpipetirali po 10 µl mešanice in 10 µl ustreznega RNA vzorca ter previdno zmešali s pipeto. Sledila je 30 minutna inkubacija pri 37 °C v termopomnoževalniku (RT). Dobljeno cDNA smo nato redčili 1:2 s puffrom TE (dodatek 20 µl pufra TE v vsako epruvetko).

V vsako od 12 komercialno pripravljenih epruvetk s PCR-mix-1 reagenti (PCR mešanica) smo dodali po 10 µl PCR-mix-2 reagenta (PCR mešanica) in 10 µl ustrezne cDNA. V epruvetko za negativno kontrolo smo dodali 10 µl pufra, za pozitivno kontrolo pa 10 µl Rotavirus cDNA (C+). Zaprte epruvetke smo vstavili v termopomnoževalnik, ki je bil predhodno ogret na 95 °C in uporabili program za pomnoževanje (preglednica 3-4).

Preglednica 3-4. Program za pomnoževanje rotavirusne cDNA (komercialni komplet Rotavirus 280).

Proces	Temperatura/(°C)	Čas/(min)	Število ciklov
Razdvajanje	95	5	1
Razdvajanje	95	1	42
Vezava začetnih oligonukleotidov	55	1	
Podaljševanje	72	1	
Končno podaljševanje	72	1	1

Analiza PCR produktov je potekala z gelsko elektroforezo (2% agarozni gel). Dolžina specifično pomnoženega pridelka je 280 bp.

### 3.2.5 Reakcija PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (vgnezdena PCR)

Pri reakciji PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi smo uporabili dve različni reakcijski mešanici z različnima DNA polimerazama in sicer Go *Taq* polimerazo (Promega, preglednica 3-5) in *Tfi* DNA polimerazo (Invitrogen, preglednica 3-6). *Tfi* DNA polimerazo smo uporabili pri dokazovanju genotipa P[8].

Preglednica 3-5. Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (Go *Taq* polimeraza, za določanje genotipov G in P).

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen, dodan v reakcijsko mešanico (µl)
ddH <sub>2</sub> O			63,5
5x DNA pufer		1x	20
Mešanica dNTP	10 mM	0,2 mM	2
Začetni oligonukleotid 1	20 µM	0,4 µM	1
Mešanica začetnih oligonukleotidov (za genotipe G ali P)	2 µM	0,24 µM (0,4 µM vsakega)	12 (2 µl vsakega)
Go <i>Taq</i> polimeraza	5 U/µl	1 U/µl	0,5
RT-PCR produkt (1:10)			1
Končni volumen reakcije			100

Preglednica 3-6. Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (*Tfi* DNA polimeraza, za določanje genotipa P[8]).

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen, dodan v reakcijsko mešanico (µl)
ddH <sub>2</sub> O			70
5x DNA pufer	5x	1x	20
Mešanica dNTP	10 mM	0,2 mM	2
Začetni oligonukleotid 1	20 µM	0,4 µM	1
Začetni oligonukleotid 2	20 µM	0,4 µM	1
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	3
<i>Tfi</i> DNA polimeraza	5 U/µl	1 U/µl	2
RT-PCR produkt (1:10)			1
Končni volumen reakcije			100

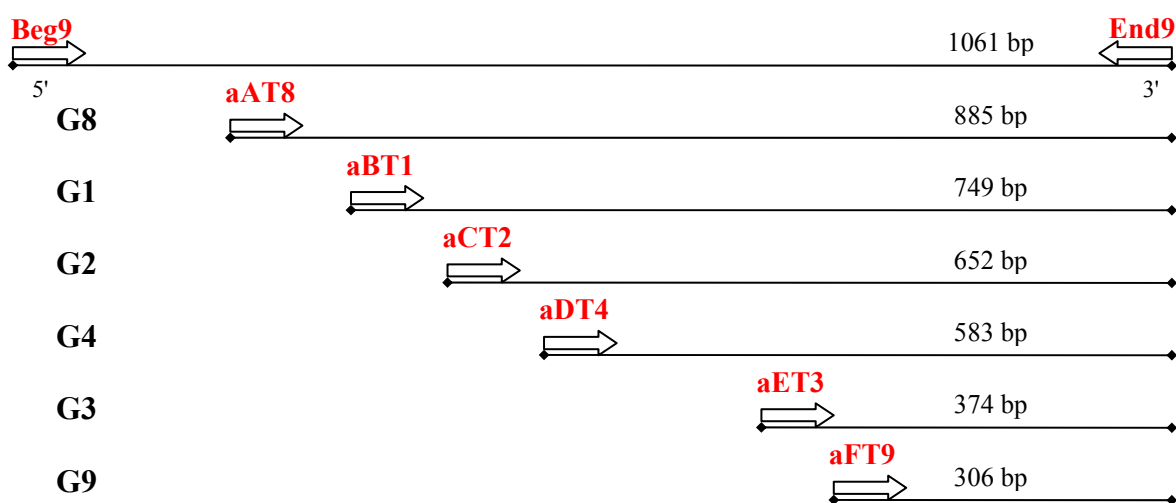
Pri tipizaciji gena G in gena P smo uporabili začetne oligonukleotide, ki prilegajo na variabilna mesta znotraj pomnoženega RT-PCR produkta. Ta variabilna mesta se med različnimi genotipi razlikujejo in glede na dolžino pomnoženega dela DNA lahko po PCR reakciji z notranjimi začetnimi oligonukleotidi določimo genotip v vzorcu. Za določanje genotipov gena G smo uporabili začetne oligonukleotide aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8, aFT9 in Beg9 (preglednica 3-7 in slika 3-2) ter 1T-1A, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1, SE-1 in con3 za določanje genotipov gena P (preglednica 3-8 in slika 3-3).

Preglednica 3-7. Pomembne značilnosti začetnih oligonukleotidov aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8 in aFT9.

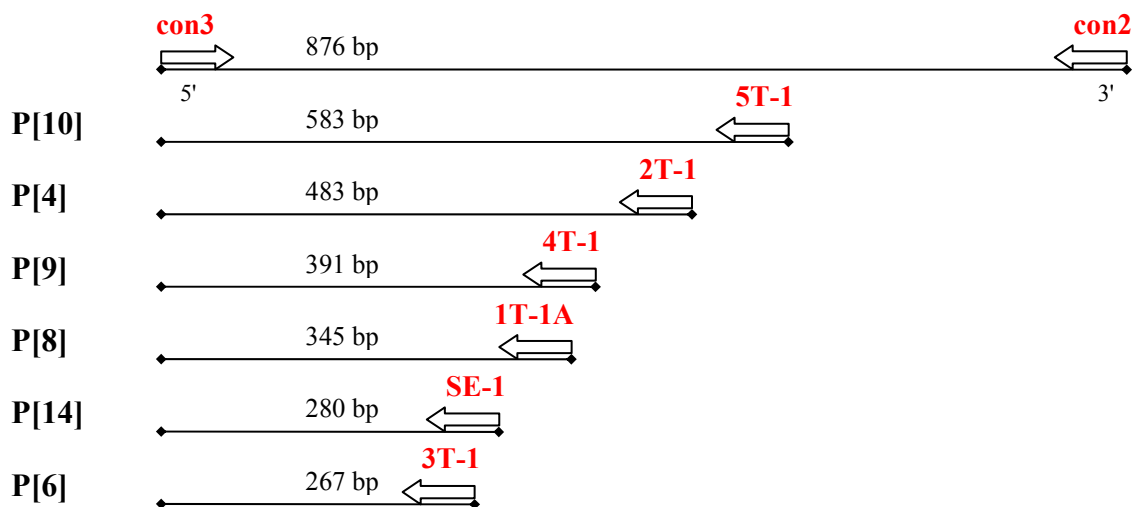
Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	Mesto prileganja	T <sub>m</sub> / (°C)	Določanje genotipa
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314-335	60	G1
aCT2	ATGATATTAACACATTTTCTGTG	413-435	58	G2
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689-709	60	G3
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480-498	58	G4
aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	178-198	58	G8
aFT9	CTAGATGTAACACTACAACACTAC	757-776	54	G9

Preglednica 3-8. Pomembne značilnosti začetnih oligonukleotidov 1T-1A, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1 in SE-1.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	Mesto prileganja	Tm/ (°C)	Določanje genotipa
1T-1A	TCTACTGGATCGACGTGC	339-356	52	P[8]
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494	58	P[4]
3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	259-278	52	P[6]
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	385-402	52	P[9]
5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	575-594	50	P[10]
SE-1	CTCTGCTATTCTACCTATTTG	271-291	58	P[14]



Slika 3-2. Skica prileganja notranjih začetnih oligonukleotidov pri reakciji PCR in dolžine pomnoženih odsekov gena G z variabilnimi regijami.



Slika 3-3. Skica prileganja notranjih začetnih oligonukleotidov pri reakciji PCR in dolžine pomnoženih odsekov gena P z variabilnimi regijami.



Za pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi smo uporabili 10x redčitve produktov RT-PCR. K 99  $\mu$ l reakcijske mešanice smo dodali 1  $\mu$ l redčenega vzorca. Končni volumen je tako znašal 100  $\mu$ l. Epruvetke smo vstavili v termopomnoževalnik in izbrali ustrezen program za tipizacijo gena G ali P (preglednice 3-9, 3-10 in 3-11).

Preglednica 3-9. Program za pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi za gen G.

Proces	Temperatura/(°C)	Čas/(min)	Število ciklov
Začetno razdvajanje	95	10	1
Razdvajanje	96	1	10
Vezava začetnih oligonukleotidov	60	0,75	
Podaljševanje	72	1,5	
Razdvajanje	96	1	
Vezava začetnih oligonukleotidov	48	0,75	30
Podaljševanje	72	1,5	
Končno podaljševanje	72	7	
			1

Preglednica 3-10. Program za pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi za gen P.

Proces	Temperatura/(°C)	Čas/(min)	Število ciklov
Začetno razdvajanje	95	10	1
Razdvajanje	96	1	40
Vezava začetnih oligonukleotidov	50	0,75	
Podaljševanje	72	1,5	
Končno podaljševanje	72	7	
			1

Preglednica 3-11. Program za pomnoževanje z notranjimi začetnimi oligonukleotidi za genotip P[8] (*Tfi* polimeraza).

Proces	Temperatura/(°C)	Čas/(min)	Število ciklov
Začetno razdvajanje	94	2	1
Razdvajanje	94	0,5	40
Vezava začetnih oligonukleotidov	50	0,5	
Podaljševanje	72	1	
Končno podaljševanje	72	10	
			1

Produkte smo analizirali z gelsko elektroforezo (2% agarozni gel).

### **3.2.6 Analiza produktov RT-PCR in PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi**

Pripravili smo 2% agarozni gel iz 1 g agaroze v prahu in 50 ml 1x pufra TAE. Agarozo smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici, jo ohladili na približno 60°C, nato pa dodali 5 µl etidijevega bromida (5 mg/ml) ter jo zlili v nosilec z nameščenim glavničkom. Ko se je gel strdil, smo ga skupaj z nosilcem potopili v banjico z 1x pufrom TAE.

Na mikrotitrski ploščici smo v vsako luknjico odpipetirali 2 µl 6x nanašalnega pufra in 10 µl vzorca pomnoženih odsekov ter mešanico nanesti v vdolbinice na gelu. Na gel smo poleg vzorcev, negativne in pozitivne kontrole nanesti še 5 µl komercialno pripravljene molekularnega označevalca (100 bp).

Elektroforeza je potekala 50 minut pri napetosti 90 V.

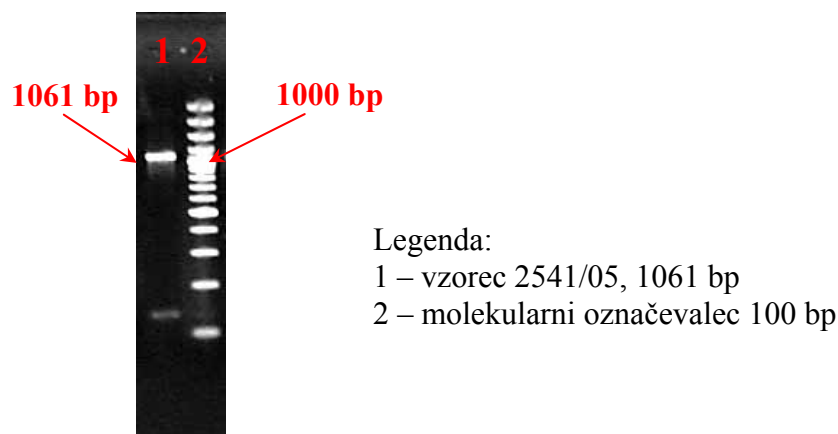
Po končani elektroforezi smo gel previdno odstranili iz banjice in ga prenesli v UV transiluminator ter z računalniškim programom in kamero dokazali PCR produkte. Vidljivost pomnoženih odsekov pod ultravijolično svetlobo smo omogočili z dodatkom etidijevega bromida v agarozni gel.

Pomnoženi odseki so se zaradi različne hitrosti potovanja ločili po velikosti. Glede na molekularni označevalec smo nato velikost lahko tudi določili.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE GENA G Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO REVERZNE TRANSKRIPCije IN POMNOŽEVANJA DNA (Access RT PCR System)

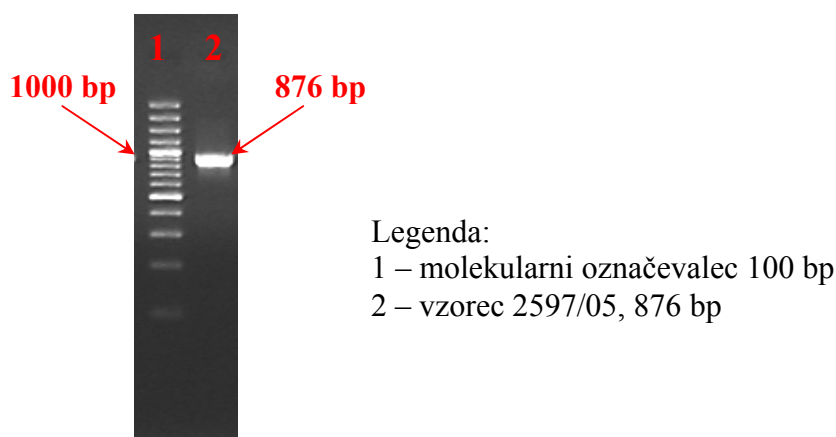
Z RT-PCR smo z začetnimi oligonukleotidi Beg9 in End9, *Tfl* DNA polimerazo in mešanico reagentov komercialnega kompleta Access RT PCR Sytem (Preglednica 3-1) pomnožili odsek gena G, dolg 1061 bp. Program za pomnoževanje v termopomnoževalniku je zapisan v preglednici 3-3. Uspešno smo pomnožili RNA pri 93 vzorcih, pri 6 vzorcih RNA nismo pomnožili, pri enem vzorcu pa je bil pomnoženi odsek nespecifičen.



Slika 4-1. Odseki DNA po RT-PCR za gen G.

### 4.2 DOLOČANJE GENA P Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO REVERZNE TRANSKRIPCije IN POMNOŽEVANJA DNA (Access RT-PCR System)

Uporabili smo enako reakcijsko mešanico kot pri pomnoževanju gena G (Preglednica 3-1) ter začetna oligonukleotida con2 in con3, ki sta specifična za gen P in omogočata pomnoževanje odseka gena P, dolgega 876 bp. Program za RT-PCR reakcijo je zapisan v preglednici 3-3. Uspešno smo pomnožili RNA pri 96 vzorcih, pri 4 vzorcih je bil rezultat negativen.



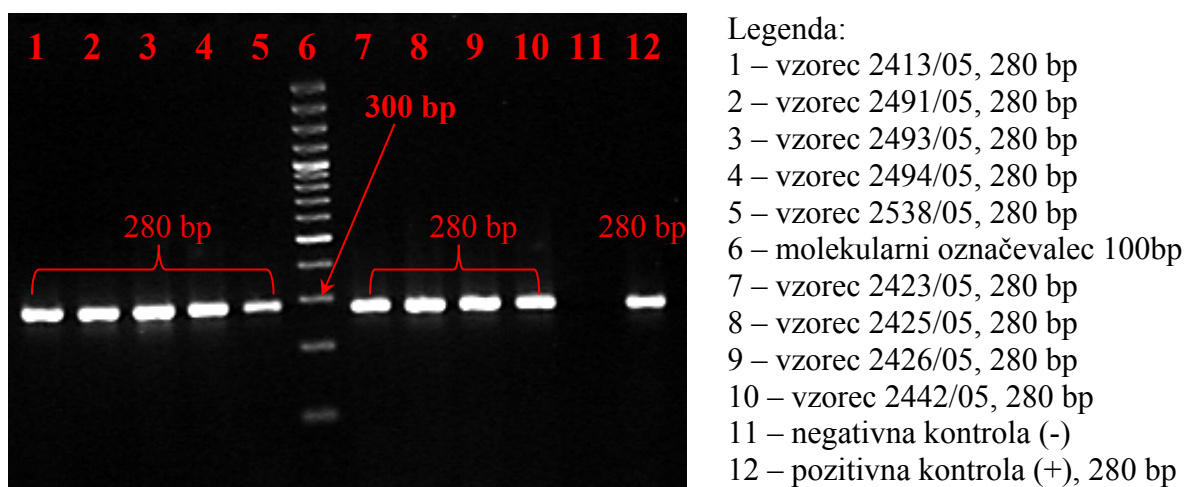
Slika 4-2. Odseki DNA po RT-PCR za gen P.

#### 4.3 DOLOČANJE ROTAVIRUSNE RNA S KOMERCIALNIM KOMPLETOM Rotavirus 280

Za preizkušanje komercialnega kompleta Rotavirus 280 smo izbrali 18 od 100 vzorcev (vključenih v našo raziskavo) v katerih so predhodno dokazali rotaviruse z reakcijo ELISA in/ali EM. Izbrali smo 12 vzorcev, pri katerih smo uspešno pomnožili oba odseka gena G in P, 2 vzorca z uspešno pomnoženim odsekom gena G ali P ter 4 vzorce (2538/05, 2566/05, 41/06 in 62/06), kjer nismo pomnožili niti odseka gena G niti odseka gena P. Poleg teh vzorcev smo z omenjenim komercialnim kompletom testirali še 10 vzorcev, v katerih so predhodno dokazali kaliviciruse.

Reakciji reverzne transkripcije in pomnoževanja smo izvedli po priloženem protokolu (poglavje 3.2.4), program pomnoževanja smo prilagodili (Preglednica 3-4). Za optimizacijo smo uporabili vzorec 2594/05, katerega gen G in gen P smo uspešno pomnožili z Access RT-PCR. Za reakcijo smo uporabili neredčeno RNA in redčeno RNA (1:10, 1:100). Specifično pomnoženi odseki DNA so bili dolgi 280 bp. Z analizo PCR produktov smo ugotovili, da je reakcija potekla uspešno tako pri neredčenih kot tudi pri redčenih vzorcih. Najlepše so se pod UV transiluminatorjem videle lise pomnoženih odsekov neredčenega vzorca, zato v nadaljevanju RNA nismo redčili. Pri analizi smo ugotovili, da je mešanici reagentov dodano tudi barvilo, vidno pod UV transiluminatorjem, zato ga pred elektroforezo ni bilo potrebno dodajati.

S komercialnim kompletom Rotavirus 280 smo uspeli pomnožiti in dokazati rotavirusno RNA pri vseh 18 testiranih vzorcih, izbranih iz nabora 100 preiskovanih vzorcev. Pri 6 vzorcih, kjer s komercialnim kompletom Access RT-PCR System nismo pomnožili RNA, smo s kompletom Rotavirus 280 dokazali rotavirusno RNA. Prav tako smo rotavirusno RNA dokazali pri 12 vzorcih, ki smo jih dokazali tudi z RT-PCR. Negativne rezultate smo dobili pri 10 vzorcih, v katerih so bili predhodno že dokazani kalicivirusi in ne rotavirusi (Preglednica 4-1).



Slika 4-3. Odseki DNA po RT-PCR, komercialni komplet Rotavirus 280.

Preglednica 4-1. Rezultati preizkušanja komercialnega kompleta Rotavirus 280.

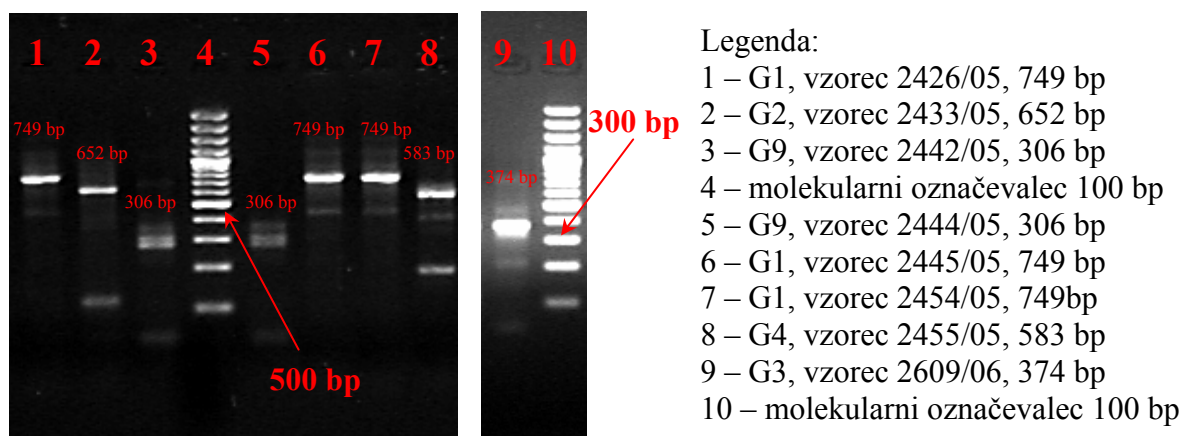
Komercialni komplet	Access RT-PCR <b>negativen rezultat</b>	Access RT-PCR <b>pozitiven rezultat</b>
Rotavirus 280 <b>negativen rezultat</b>	10 (kalicivirusi)	0
Rotavirus 280 <b>pozitiven rezultat</b>	6	12

#### 4.4 GENOTIPIZACIJA GENA G, PCR S SPECIFIČNIMI NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (vgnezdena PCR)

Za genotipizacijo gena G smo uporabili produkte RT-PCR. Za PCR smo uporabili reakcijsko mešanico (Preglednica 3-5), začetni oligonukleotid End9 in 6 specifičnih notranjih začetnih oligonukleotidov (Preglednica 3-7), s katerimi smo določali genotipe

G1, G2, G3, G4, G8 in G9. Reakcijo pomnoževanja z notranjimi začetnimi oligonukleotidi smo izvedli s programom v preglednici 3-9. Velikosti posameznih odsekov po končani vgnezdni PCR smo določili z gelsko elektroforezo. Za pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec, v katerem so predhodno dokazali genotip G1.

Iz slike 4-4 je razvidno, da smo uspeli določiti genotipe G1 z dolžino odseka 749 bp, G2 z dolžino odseka 652 bp, G4 z dolžino odseka 583 bp, G3 z dolžino odseka 374 bp in G9 z dolžino odseka 306 bp.

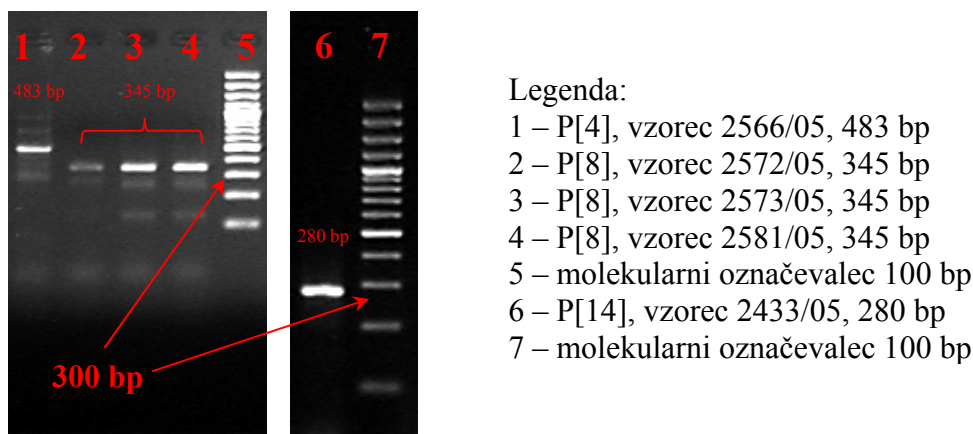


Slika 4-4. Odseki DNA po vgnezdni PCR reakciji za G genotipizacijo.

#### 4.5 GENOTIPIZACIJA GENA P, PCR S SPECIFIČNIMI NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (vgnezdena PCR)

Za genotipizacijo gena P smo uporabili ustrezno reakcijsko mešanico (preglednica 3-5) s specifičnimi notranjimi začetnimi oligonukleotidi (preglednica 3-8) ter programom PCR (preglednica 3-10). Določali smo genotipe P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] in P[14]. Za pozitivno kontrolo smo uporabljali vzorec, pri katerem so predhodno dokazali genotip P[8].

Določili smo odseke, dolge 483 bp (genotip P[4]), 345 bp (genotip P[8]) in 280 bp (genotip P[14]).

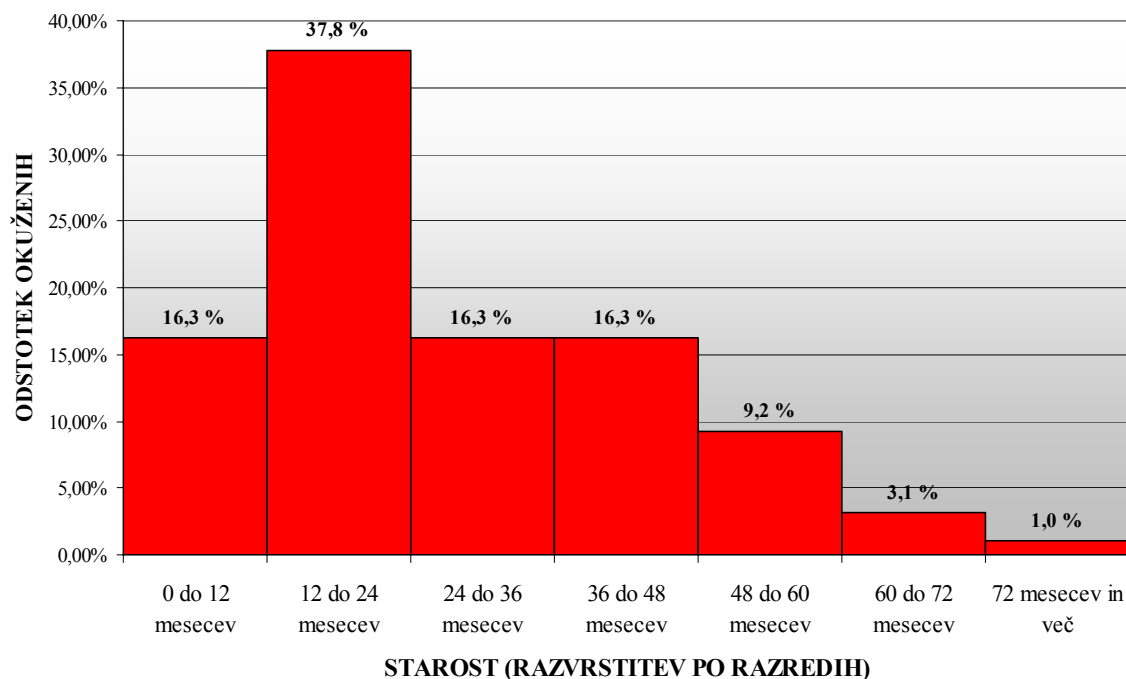


Slika 4-5. Odseki DNA po vgnezdni PCR reakciji za P genotipizacijo.

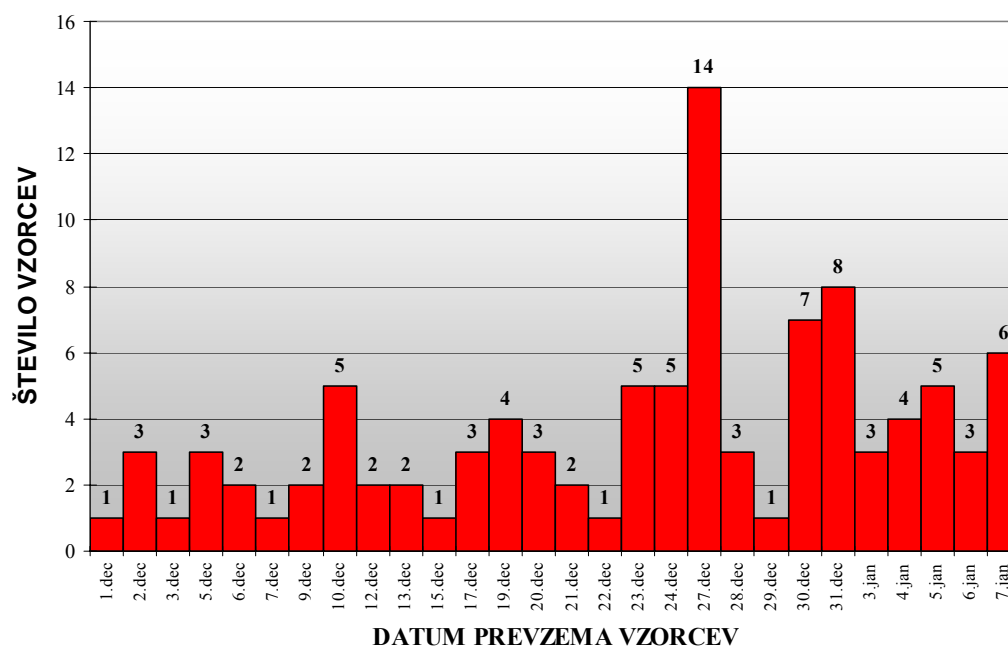
#### 4.6 ZNAČILNOSTI VZORCEV

Pregledali smo 100 vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok z gastroenteritisom v obdobju od 1.12.2005 do 7.1.2006. V vzorcih so predhodno že dokazali rotaviruse z reakcijo ELISA in/ali EM. S testom ELISA so dokazali rotaviruse skupine A pri 96 vzorcih. Z metodo elektronske mikroskopije le pri enem od 100 pregledanih vzorcev niso določili rotavirusov, pri vseh ostalih (99) so jih dokazali.

Največ vzorcev, pri katerih so določili rotaviruse, so pregledali 27. decembra 2005 (Slika 4-7). Od 100 vzorcev iztrebkov so jih 50 odvzeli bolnikom moškega spola in 50 bolnicam ženskega spola. Povprečna starost bolnikov je bila 2 leti in 3 mesece. Najmlajši bolnik je bil star 21 dni (deček), najstarejša bolnica pa 8 let in 2 meseca. Po statistični analizi smo ugotovili, da je bilo največje število okužb pri bolnikih med 1. in 2. letom starosti (37,8 %). Ostale podatke o porazdelitvi okužb z rotavirusi po starostnih razredih smo podali na sliki 4-6. Pri dveh osebah ob odvzemu vzorca niso zabeležili datuma rojstva, zato ju nismo upoštevali pri analizah starosti.



Slika 4-6. Porazdelitev okužb z rotavirusi po starostnih razredih, 1. december 2005 - 7. januar 2006.



Slika 4-7. Število dnevno prevzetih vzorcev pri katerih so z ELISA in EM določili rotaviruse, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

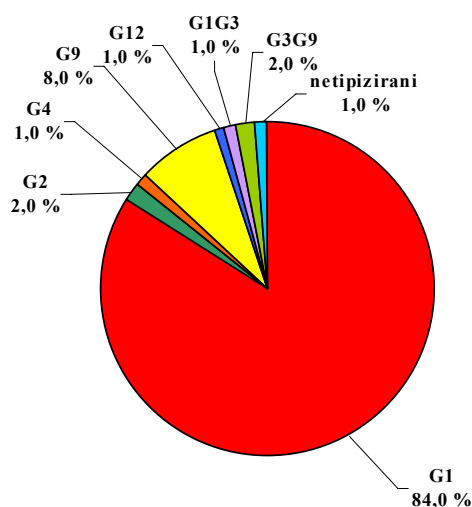
V genotipizacijo smo vključili vse vzorce. Vzorce, katerih pomnoženi odseki so bili po RT-PCR jasno vidni pod UV transiluminatorjem, smo pred reakcijo PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi redčili 1:10. Vzorcev, katerih rezultati so bili pri RT-PCR



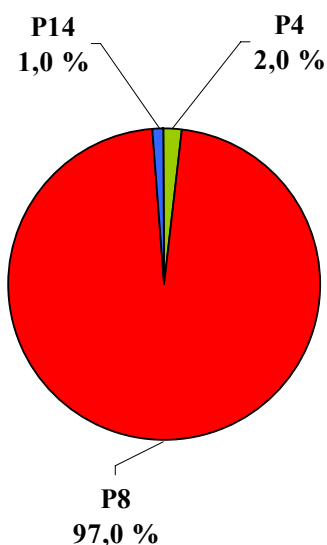
negativni, nismo redčili. Uspeli smo določiti genotipe pri 95,0 % vzorcev (genotip G in P), pri enem (1,0 %) vzorcu smo določili le genotip P. 4 vzorce, pri katerih nismo uspeli določiti genotipa ali pa smo dobili dvoumen rezultat, smo določili nukleotidno zaporedje s sekvenciranjem. Pri vzorcu 2433/05 smo potrdili genotip P[14], za vzorec 48/06 smo dokazali genotip P[4], v vzorcu 19/06 pa smo določili genotip G9. Odkrili pa smo še genotip G12 (vzorec 2486/05), ki ga v Sloveniji pred letom 2005 še niso dokazali.

Pri večini vzorcev (83,0 %) smo dokazali genotip G1. Pri 9,0 % vzorcev smo ugotovili genotip G9. Dokazali smo tudi eno okužbo z G4 (1,0 %), eno z G12 (1,0 %) in dva primera okužbe z genotipom G2 (2,0 %). Določili smo še tri mešane okužbe, G1G3 (1,0 %) in G3G9 (2,0 %). Enemu vzorcu (1,0 %) nismo uspeli določiti genotipa G (Slika 5-1). Pri vseh vzorcih smo določili genotip P. Najpogostejši genotip je bil P[8] v 97,0 %. V dveh primerih (2,0 %) smo določili genotip P[4] in v enem (1,0 %) P[14] (Slika 5-2). Mešanih okužb pri določanju genotipov P nismo dokazali.

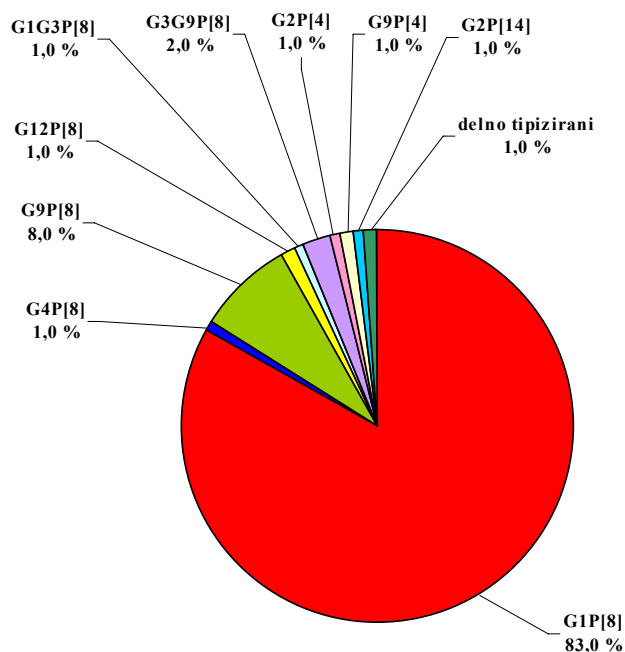
Določili smo kar 83,0 % genotipov G1P[8]. Genotip G9P[8] smo dokazali v 8,0 %. Ostali genotipi so se pojavljali redkeje: G2P[4] (1,0 %), G2P[14] (1,0 %), G4P[8] (1,0 %), G9P[4] (1,0 %) in G12P[8] (1,0 %). Ugotovili smo tudi dve mešani okužbi G3G9P[8] (2,0 %) in eno mešano okužbo G1G3P[8] (1,0 %). Pri enem vzorcu smo lahko določili le genotip P[8] (1,0 %). Genotipizirati nam je uspelo kar 99,0 % vzorcev, en vzorec (1,0 %) smo delno tipizirali (Priloge A, B in C).



Slika 5-1. Pogostost genotipov G, 1. december 2005 - 7. januar 2006.



Slika 5-2. Pogostost genotipov P, 1. december 2005 - 7. januar 2006.



Slika 5-3. Pogostost genotipov, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

Osnovne podatke in rezultate reakcij ELISA, EM, RT-PCR (Access RT-PCR System; Rotavirus 280), PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi in sekvenciranja smo prikazali v Prilogi A. Pogostost posameznih genotipov G in P sta v Prilogi B, preglednica pogostosti genotipov pa je v Prilogi C.

## 5 RAZPRAVA

Rotavirusi skupine A so glavni povzročitelji drisk pri novorojenčkih in otrocih starih do 5 let (Kapikian in Chanock, 1990; Parashar in sod., 1998; Samajdar in sod., 2006). Zaradi rotavirusnih okužb vsako leto umre tudi do 705000 otrok, največ v razvijajočih se deželah (Parashar in sod., 2006). Zaradi ekonomskega bremena hospitalizacij (približno 2 milijona otrok na leto) in zdravljenja je nujno potreben razvoj kakovostnih in učinkovitih cepiv. Trenutno sta v uporabi dve cepivi (RotaTeq in Rotarix), katerih vpliv na smrtnost in epidemiologijo bo znan v prihodnosti (Dennehy, 2007; Angel in sod., 2007). Ker ščitita le pred okužbami določenih genotipov rotavirusov, obstaja možnost razširjanja do sedaj manj pogostih genotipov.

Za razvoj cepiv je nujno spremljanje epidemiologije rotavirusov, kajti le tako lahko pripravijo cepivo, ki bo ščitilo otroke pred večino okužb z rotavirusi. Z molekularnimi metodami so do sedaj dokumentirali 15 G in 27 P rotavirusnih genotipov skupine A (Martella in sod., 2006; Rahman in sod., 2005; Steyer in sod., 2007b). Pri ljudeh so določili 11 genotipov G in 13 genotipov P (Martella in sod., 2004, Martella in sod., 2006; De Grazia in sod., 2007). Poročali so že o številnih kombinacijah G/P genotipov. Ob zadnjem pregledu rotavirusnih genotipov so dokazali pogostejše pojavljanje štirih genotipov: G1P[8], G2P[4], G3P[8] in G4P[8]. Poleg njih postajajo vse bolj pogosti tudi genotipi G9P[8] in G9P[6] (Gentsch, 1996; Desselberger in Gray, 2005; Desselberger in sod., 2006).

### 5.1 DOLOČANJE GENA G IN P Z ENOSTOPENJSKO REAKCIJO REVERZNE TRANSKRIPCIJE IN POMNOŽEVANJA DNA (Access RT-PCR System)

Za pomnoževanje gena G smo uporabili metodo Access RT-PCR (Promega), s katero smo hkrati izvedli dve reakciji: reverzno transkripcijo (prepis RNA v DNA) in pomnoževanje DNA. Reakcijo smo izvajali z že prej optimiziranim programom RT-PCR (Steyer, 2002) s temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov 56 °C (Preglednica 3-3). Pri pomnoževanju prvih 20 vzorcev smo opazili kar nekaj negativnih rezultatov. Domnevali smo, da je to lahko posledica prevelike koncentracija osamljene RNA v vzorcu, zato smo reakcijo ponovili z redčenjem RNA 1:10. Pri ponovitvi poskusa z redčeno osamljeno RNA

smo odseke uspešno pomnožili. Pri nadaljnjem pomnoževanju smo vzorce RNA vedno redčili 1:10. Z reakcijo RT-PCR smo preverjali tudi ddH<sub>2</sub>O brez RNaz, ki smo jo uporabljali pri osamitvi RNA iz vzorcev iztrebkov. V vseh primerih nismo zaznali pomnoženih pridelkov in tako dokazali, da uporabljena voda ni bila kontaminirana.

Pri pomnoževanju gena P nismo imeli težav. Tudi tu smo uporabili že optimiziran program pomnoževanja s temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov 50 °C (Steyer, 2002).

Pri pregledu skupnih rezultatov smo ugotovili, da nam pri pomnoževanju odsekov gena G in P pri vzorcih 2538/05, 2566/05, 41/06 in 62/06 ni uspelo dokazati rotavirusne RNA. Pri vzorcih 2413/05 in 2561/05 smo pomnožili le odsek gena P, ne pa tudi gena G. Pri vzorcih 2538/05, 2566/05, 41/06 in 62/06 smo po osamitvi RNA iz vzorcev opazili rjavkasto oborino. Domnevamo, da so bile to nečistoče, ki so ovirale pomnoževanje RNA.

## 5.2 DOLOČANJE ROTAVIRUSNE RNA S KOMERCIALNIM KOMPLETOM Rotavirus 280

Komercialni komplet Rotavirus 280 je namenjen za reakciji reverzne transkripcije in pomnoževanja nukleinskih kislin. Ker sta to dve ločeni reakciji je pri tej metodi možnost kontaminacije večja kot pri metodi Access RT-PCR, kjer sta reverzna transkripcija in pomnoževanje DNA združeni. Komplet Rotavirus 280 vsebuje reagente za 50 testov, komplet Access RT-PCR pa za 100. Ugotovili smo, da je metoda Rotavirus 280 v primerjavi z metodo Access RT-PCR enostavnejša in hitrejša. Reakcijska mešanica je bila že pripravljena, ni nam bilo potrebno dodajati začetnih oligonukleotidov (hitrejša predpriprava), reverzna transkripcija je potekala 30 minut, pomnoževanje DNA pa 2 uri in 12 minut (RT in PCR skupaj 2 uri in 42 minut). Pri kompletu Access RT-PCR smo pred RT-PCR pripravili reakcijsko mešanico in dodali začetne oligonukleotide, katerih komplet ne vsebuje. Poleg daljše predpriprave je bil daljši tudi čas RT-PCR, ki je trajal 3 ure in 14 minut. Pred elektroforezo smo produktom morali dodajati nanašalni pufer. Pri kompletu Rotavirus 280 dodajanje barvila ni bilo potrebno, ker ga je pripravljena reakcijska mešanica že vsebovala.

Časovna razlika med reakcijami obeh kompletov je bila 32 minut. Z metodo Rotavirus 280 smo uspeli pomnožiti RNA tudi pri tistih vzorcih, katerih pomnoževanje specifičnih odsekov G in P z Access RT-PCR ni bilo uspešno. Glede na to lahko sklepamo, da je metoda Rotavirus 280 bolj občutljiva, vendar tega ne moremo zagotovo trditi, saj smo testirali premajhno število vzorcev. Ugotovili smo, da je Rotavirus 280 uporaben za hitro molekularno diagnostiko. Ker je to kvalitativen test, nam omogoča le določanje rotavirusne RNA. V primeru epidemioloških študij je bolj uporaben komplet Access RT-PCR, ki nam omogoča pomnožitev specifičnega odseka gena za nadaljnjo genotipizacijo.

### 5.3 GENOTIPIZACIJA GENOV G IN P S SPECIFIČNIMI NOTRANJIMI ZAČETNIMI OLIGONUKLEOTIDI (vgnezdena PCR)

Za genotipizacijo gena G in gena P smo uporabili specifične notranje začetne oligonukleotide, ki se prilegajo variabilnim mestom znotraj pomnoženega RT-PCR produkta. Variabilna mesta so znotraj določenega genotipa ohranjena, zato smo lahko glede na različne dolžine pomnoženih odsekov določili genotip. S sekvenciranjem so pri rotavirusnih sevih v Sloveniji leta 2001 določili točkovne mutacije na mestu prileganja začetnega oligonukleotida za genotipizacijo P[8], zato smo pri genotipizaciji P namesto 1T-1 uporabili spremenjen začetni oligonukleotid 1T-1A (neobjavljeno). Program za pomnoževanje gena G so priredili tako (Steyer, 2002), da prvih 10 ciklov (razdvajanje, vezava začetnih oligonukleotidov in podaljševanje) poteka pri višji, naslednjih 30 pa pri nižji temperaturi (Preglednica 3-9). S takimi pogoji smo preprečili nastajanje nespecifičnih produktov pomnoževanja. Pri genotipizaciji gena G nismo imeli težav, pri določanju genotipov P pa smo velikokrat opazili negotove, slabe ali celo negativne rezultate. Odločili smo se preizkusiti kakovost uporabljenih začetnih oligonukleotidov. Pripravili smo tudi nove raztopine začetnih oligonukleotidov in izvedli reakcijo vgnezdene PCR. V poskus smo vključili tri vzorce, katerih genotipe smo že uspeli določiti. Ugotovili smo, da so bili uporabljeni začetni oligonukleotidi slabi, zato smo pri nadaljnjih reakcijah uporabljali nove. Poleg genotipov P[4], P[8] in P[14] smo dobili tudi precejšnje število šibko vidnih odsekov 345 bp (genotip P[8]) in ponovno veliko negativnih rezultatov. Odločili smo se za preizkus nove DNA polimeraze. Reagente s *Tfi* DNA polimerazo (Invitrogen) in program vgnezdene PCR smo najprej optimizirali, nato ponovili reakcijo pri vzorcih, katerih

genotipizacija ni uspela. Rezultat reakcije je bil znova negativen. Ker smo predvidevali, da je večina nedoločljivih vzorcev genotipa P[8], smo se odločili preizkusiti vgnezdno PCR z reakcijsko mešanico, kateri smo dodali le začetna oligonukleotida con3 in 1T-1A s povečano koncentracijo (20  $\mu$ M). Pri takšnih pogojih nam je uspelo določiti genotip P[8] pri dotlej nedoločljivih vzorcih.

Da bi ugotovili pravi vzrok naših težav pri določanju genotipa P[8], bi morali celotnemu pomnoženemu odseku gena P določiti nukleotidno zaporedje. Zaradi visoke stopnje točkovnih mutacij lahko le-te nastanejo tudi na genskih odsekih, ki kodirajo proteina VP7 in VP4. To je lahko vzrok za neuspešno prileganje začetnih oligonukleotidov, ki jih uporabljamo za genotipizacijo. Posledica so lahko napačno ali neuspešno tipizirani rotavirusni sevi (Iturriza-Gómara in sod., 2000). Pred leti so v Sloveniji ugotavljali podobne težave pri določanju genotipa P[8] (Steyer, 2002). Podobne pojave so opazali tudi na Madžarskem, kjer so ugotovili, da so se na mestu vezave specifičnega oligonukleotidnega začetnika 1T-1 pojavile mutacije. Ob upoštevanju teh točkovnih mutacij so s spremembo oligonukleotidnega začetnika 1T-1 ponovno omogočili določanje genotipa P[8] (Bányai in sod., 2005). Sklepamo, da je tudi v našem primeru prišlo do sprememb na odseku gena P, kamor prilega notranji specifični začetni oligonukleotid 1T-1A. Najverjetneje so vzrok za to točkaste mutacije ali prerazporejanje genoma.

Zaradi težav metode PCR, kot v našem primeru pri določanju genotipa P, so razvili tehniko dokazovanja genotipov z mikromrežami. S čipi, na katerih je tudi do 12 različnih začetnih oligonukleotidov (označenih s fluorescentnim barvilom) za posamezne genotipe G in P, so lahko določili prej nedoločljive genotipe in mešane okužbe s PCR. Prav tako so brez težav določili genotipe referenčnih kot tudi porajajočih se novih sevov. Metoda je veliko bolj občutljiva kot RT-PCR in vgnezdna PCR in omogoča genotipizacijo VP7 genov (G1 do G6, G8 do G10 in G12) ter VP4 genov (P[4], P[6], P[8], P[9] in P[14]) (Honma in sod., 2007).

Uspešno smo določili genotipe vzorcev, pri katerih z RT-PCR nismo uspešno prepisali in pomnožili rotavirusne RNA do količine, ki bi jo lahko dokazali v agaroznem gelu.

Sklepamo, da je vzrok za to majhna količina pomnožene DNA. V vzorcih so lahko bili še inhibitorji pomnoževanja.

#### 5.4 ZNAČILNOSTI VZORCEV

Kljub temu, da pri štirih vzorcih, vključenih v našo raziskavo, predhodno s testom ELISA niso dokazali rotavirusov, smo z molekularnimi metodami dokazali rotaviruse skupine A, genotip G1P[8]. Točkovne mutacije na genskih odsekih, ki kodirajo strukturne proteine, povzročijo tudi spremembe v zgradbi le-teh. Zaradi tega protitelesa ne prepoznajo antigenskih determinant, pojav pa nekateri imenujejo »pobeg protitelesom« (Iturriza-Gómara in sod., 2001).

Rotavirusne okužbe so najpogostejše od 6. meseca do 5. leta starosti. Novorojence navadno pred okužbami z rotavirusi zavarujejo materina zaščitna protitelesa, po 3. mesecu starosti pa titer protiteles upade (Angel in sod., 2007). Dokazali smo rotaviruse (genotip G1P[8]) v petih vzorcih, ki so jih odvzeli hospitaliziranim otrokom, mlajšim od šest mesecev. Domnevamo lahko, da materina protitelesa niso ščitila pred okužbo z genotipom G1[8], da je bil otrok imunsko pomanjkljiv ali pa je okužba vzrok bolnišnično pridobljene okužbe. Te se pojavljajo tako pri novorojenčkih kot tudi starejših otrocih in celo starostnikih (Chandran in sod., 2006). Rotaviruse smo dokazali pri 4 otrocih, ki so bili starejši od 5 let. Vse ostale okužbe smo dokazali pri otrocih med 6. mesecem in 5. letom starosti (90,8 %).

Glede na dobljene rezultate ugotavljamo, da je kakor v prejšnjih letih, najpogostejši genotip v Sloveniji G1P[8]. Drugi najpogostejši genotip v naši raziskavi je bil G9P[8], ki se je prvič v Sloveniji pojavil šele v rotavirusni sezoni 2001/02. V sosednjih državah so opazili porast genotipa G9 v zadnjih letih. Prve seve genotipa G9 so v Italiji dokazali okoli leta 1990 (Arista, 1997), leta 1999 pa je predstavljal že tretjino najbolj pogostih rotavirusnih genotipov G (Arista in sod., 2003). Leta 2005 so na Siciliji določili genotip G9 pri 60,8 % rotavirusnih okužb pri otrocih (De Grazia in sod., 2007). Na Madžarskem so genotip G9 prvič dokazali v rotavirusni sezoni 1997-1998 (Bányai in sod., 2004a; Bányai in sod., 2004b), v sezoni 1999-2000 pa je že predstavljal drugi najpogostejši genotip v

Budimpešti in okolici ter četrti najbolj pogosti genotip v pokrajini Baranya (Bányai in sod., 2004a). Pri raziskavi v Demokratični republiki Kongo so ugotovili, da so aminokislinska zaporedja (AK) seva G9P[8], določenega na Madžarskem, od 98,6 do 98,9% identična AK zaporedju sevov G8P[8] in G8P[6]. Postavili so teorijo, da bi sev G9P[8] lahko bil dajalec genomskega odseka VP4 (P[8]) sevom G8P[8] in G8P[6] (Matthijnsens in sod., 2006).

Redka genotipa G2P[4] in G4P[8] so dokazali že prej, prav tako so jih določili tudi v sosednjih državah (Tcheremenskaia in sod., 2007; Bányai in sod., 2004a; Bányai in sod., 2004b; Bányai in sod., 2004c; Bányai in sod., 2005; Frühwirth, 2000; De Grazia in sod., 2007). V Sloveniji smo v tej raziskavi prvič določili genotip G9P[4] (rotavirusna sezona 2005/06). V istem letu so ga dokazali tudi na Hrvaškem (Tcheremenskaia in sod., 2007).

Zelo redek genotip P[14] smo v Sloveniji določili prvič. Do leta 1999 so zabeležili le nekaj primerov na Finskem, v Južni Afriki in Egiptu. O osamljenih primerih so poročali iz Italije, Madžarske, Tajske in Avstralije. Poročali so tudi o zajčjih rotavirusnih sevih P[14] (3 iz ZDA in 1 iz Japonske). Predvidevajo, da so izvor tega genotipa prav zajčji rotavirusi. Človeški rotavirusni genotip P[14] se je do sedaj pojavljal v kombinaciji z genotipi G8, G6 in G10, nikoli z G2 (Holmes in sod., 1999). V sosednjih državah (v Italiji in na Madžarskem) so dokazali genotip G6P[14] (Gerna in sod., 1994; Bányai in sod., 2003). Nukleotidna zaporedja Italijanskega rotavirusnega seva P[14] se v 95 % ujemajo z nukleotidnim zaporedjem seva P[14], ki smo ga določili v naši raziskavi.

Pri našem delu smo v Sloveniji prvič določili tudi genotip G12P[8] (retrospektivna študija). Prav tako so leta 2006 v dveh primerih dokazali rotavirusni genotip G12P[8] (Steyer in sod., 2007a). Genotip G12P[8] so prvič dokazali na Filipinih med leti 1987 in 1988 (Taniguchi in sod., 1990). V Indiji je od leta 2003 do 2005 pogostost okužb z genotipom G12 narasla iz 4,2 % na 30,0 %. Pojavljal se je v kombinaciji s P[4], P[6] in P[8] (Samajdar in sod., 2006). G12P[8] se je nedavno pojavil v Evropi, prvič leta 2002 v Angliji (Rahman in sod., 2007). Na Madžarskem so leta 2005 prvič odkrili rotavirusni sev G12P[8] (Bányai in sod., 2007). Razširjanje rotavirusnega genotipa G12 po svetu (Filipini, Združene države, Južna Amerika, Južna Azija, Afrika, Evropa) je zelo podobno poti



širjenja genotipa G9, ki je postal peti najpomembnejši genotip v poznih 90ih letih prejšnjega stoletja (Iturriza Gómara in sod., 2003).

Kljub temu, da smo okužbe z mešanimi genotipi (G1G9, G3G9) dokazali, bi rezultati letih lahko bili posledica navzkrižnih reakcij začetnih oligonukleotidov zaradi sprememb nukleotidnega zaporedja RNA odsekov. V Italiji so v rotavirusni sezoni 2001/02 proučevali zaporedja gena VP7 sevov genotipa G9, ki jih z metodo PCR niso mogli določiti. Spoznali so, da sta vzrok za neuspešno tipizacijo dva dejavnika in sicer akumulacija mutacij na za genotip G9 specifičnih mestih in relativno kratek specifični oligonukleotidni začetnik za določanje genotipa G9 (le 20 nt). Na podlagi začetnega oligonukleotida aFT9 so naredili novi oligonukleotidni začetnik. Slednji prilega tako na ustrezno nukleotidno zaporedje referenčnega seva G9 kot tudi na nukleotidno zaporedje vseh sevov G9, ki jih z metodo PCR niso določili (Martella in sod., 2004). Mešane okužbe se pojavljajo povsod po svetu, vendar so pogostejše v razvijajočih se deželah, kjer se pojavlja tudi več nenavadnih genotipov. Nenavadni genotipi so lahko posledica prenosa živalskih sevov na človeka in prerazporejanja genomskih odsekov v dvojno okuženih celicah (Desselberger in sod., 2006; Matthijnssens in sod., 2006). Porajanje novih sevov ima lahko velik vpliv na prevladujoče genotipe po svetu. Obstoječa cepiva ščitijo pred rotavirusnimi okužbami najpogosteje pojavljajočih se genotipov, zato obstaja velika verjetnost razširjanja manj pogostih in nenavadnih rotavirusnih sevov. To smo potrdili tudi v naši raziskavi, saj smo v le 100 preiskovanih vzorcih ene rotavirusne sezone odkrili kar tri genotipe, ki se v Sloveniji do sedaj še niso pojavili.

## 6 SKLEPI

Kot smo predvidevali, smo poleg uveljavljenih genotipov G1P[8], G9P[8], G4P[8] določili manj pogoste genotipe rotavirusov skupine A. V enem primeru smo določili genotip G2P[4], ki se je v Sloveniji že pojavljal (neobjavljeno). Dokazali smo genotip G12P[8], ki ga pred letom 2005 v Sloveniji še niso določili. Prav tako smo v Sloveniji prvič določili genotipa G2P[14] in G9P[4]. Pojavljanje novih genotipov v Sloveniji in po svetu ima lahko velik vpliv na učinkovitost rotavirusnih cepiv na tržišču. Hkrati je spremljanje pojavljanja novih rotavirusnih genotipov pomembno za nadaljnji razvoj novih cepiv proti rotavirusom.

Kakor v prejšnjih letih je bil tudi v rotavirusni sezoni 2005/06 v Sloveniji najpogostejši genotip G1P[8]. Drugi najpogosteje določen genotip je bil G9P[8], ki pa se je prej pojavljal v manjšem številu. Genotip G4P[8] se je v prejšnjih letih pojavljal pogosteje, kot smo ga dokazali v naši preiskavi.

Na Madžarskem in v Italiji redno spremljajo rotavirusno epidemiologijo. Za Avstrijo in Hrvaško tega ne moremo trditi, kajti podatkov o rotavirusih v teh dveh državah je zelo malo. Glede na obstoječe podatke smo našo domnevo, da se v sosednjih državah pojavljajo podobni genotipi rotavirusov kot v Sloveniji, potrdili. Pogostejši genotipi v sosednjih državah in v Sloveniji so G1P[8], G4P[8], G9P[8] in G2P[4] (Bányai in sod., 2004a; De Grazia in sod., 2007; Frühwirth, 2000; Tcheremenskaia in sod., 2007). Na Hrvaškem so že dokazali genotip G9P[4] (Tcheremenskaia in sod., 2007), katerega smo v naši raziskavi v Sloveniji določili prvič. Genotipa G3P[8], ki se pojavlja v sosednjih državah (Bányai in sod., 2005; De Grazia in sod., 2007; Frühwirth, 2000; Tcheremenskaia in sod., 2007), v tej raziskavi nismo dokazali.

Komercialni komplet Rotavirus 280 je primeren za hitro molekularno diagnostiko. Z njim smo kvalitativno določili rotavirusno RNA v vzorcu iztrebkov. Rekcijske mešanice so bile že vnaprej pripravljene, RT in PCR sta potekali hitreje kot RT-PCR s komercialnim kompletom Access, poleg tega nam pred elektroforezo ni bilo potrebno dodajati nanšalnega pufra. S kompletom Rotavirus 280 nismo mogli določiti genotipov, zato z vidika epidemiologije ni primeren.

## 7 POVZETEK

Obdelali smo 100 vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok z akutnim rotavirusnim gastroenteritisom.

Iz vzorcev smo z reagentom Trizol osamili virusno dvojnovijačno RNA ter z metodo enostopenjske reakcije reverzne transkripcije in pomnoževanja DNA prepisali dele odsekov genov z zapisom za virusni beljakovini VP7 (G) in VP4 (P). Pri reakciji smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za gen G ali gen P rotavirusov skupine A.

Pri genotipizaciji smo uporabili produkte RT-PCR. Za določanje genotipa G smo za vgnezdno PCR uporabili reakcijsko mešanico s šestimi specifičnimi notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Z njimi smo določali genotipe G1, G2, G3, G4 G8 in G9. Za določanje genotipa P smo pri vgnezdni PCR uporabili reakcijsko mešanico s šestimi specifičnimi notranjimi začetnimi oligonukleotidi za dokazovanje genotipov P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] in P[14]. Produkta pomnoževanja smo določili z gelsko elektroforezo. Z metodo sekvenciranja smo določili nukleotidno zaporedje pri štirih vzorcih, pri katerih genotipizacija ni uspela.

Osamitev RNA je bila 100% uspešna. Genotipizirati smo uspeli 99,0 % vzorcev, pri enem (1,0 %) vzorcu smo le delno določili genotip. Ugotovili smo, da so v rotavirusni sezoni 2005/06 v Sloveniji prevladovali genotipi G1P[8] (83,0 %), manj je bilo okužb z G9P[8] (8,0 %). Določili smo en primer G2P[4] (1,0 %). Prvič smo v Sloveniji dokazali genotipe G12P[8] (1,0 %), G9P[4] (1,0 %) in G2P[14] (1,0 %). Pojavljale so se tudi mešane okužbe G1G3P[8] (1,0 %) in G3G9P[8] (2,0 %).

Poleg genotipizacije smo preizkusili komercialni komplet Rotavirus 280 (*Sacace Biotechnologie*), za katerega smo ugotovili, da je uporaben le za hitro molekularno diagnostiko rotavirusnih okužb.

## 8 SUMMARY

A total of 100 rotavirus positive stool samples were collected from hospitalized children with acute viral gastroenteritis.

Trizol reagent was used for the isolation of viral double stranded RNA. RNA was used to perform RT-PCR. For amplification of VP7/VP4 rotavirus group A specific primer pairs were used.

Amplified products in RT-PCR were used as a template for genotype determination in multiplex-nested PCR. For the G gene, specific primers for genotypes G1, G2, G3, G4, G8, and G9 were used, and for the P gene, P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], and P[14]-specific primers were used. After electrophoresis, genotypes were determined according to the length of the amplified products. In four untypable strains genotype was determined by the sequence reaction.

The isolation of viral double stranded RNA was 100% successful. Genotype determination was successful in 99,0 % of samples. Only one (1,0 %) sample was partially genotyped. In rotavirus season 2005/06 in Slovenia the G1P[8] genotype was the most prevalent, found in 83 samples (83,0 %), followed by G9P[8] in 8 samples (8,0 %). We determined one G2P[4] (1,0 %) and one G4P[8] (1,0 %). For the first time in Slovenia genotypes G12P[8] (1,0 %), G9P[4] (1,0 %) and G2P[14] (1,0 %) were detected. In addition, mixed infections were determined in three samples, one G1G3P[8] (1,0 %) and two G3G9P[8] (2,0 %).

The Rotavirus 280 (*Sacace Biotechnologie*) komercial kit was tested. It can be very useful for rapid molecular diagnostics of rotavirus infections (qualitative detection of rotavirus RNA).

## 9 VIRI

- Allen A. M., Desselberger U. 1985. Reassortment of human rotaviruses carrying rearranged genomes with bovine rotavirus. *Journal of General Virology*, 66: 2703-2714
- Angel J., Franco M. A., Greenberg H. B. 2007. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 529-539
- Ansari S. A., Sattar S. A., Springthorpe V. S., Wells G. A., Tostowaryk W. 1988. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1513-1518
- Ansari S. A., Sattar S. A., Springthorpe V. S., Wells G. A., Tostowaryk W. 1989. *In vivo* protocol for testing efficacy of hand-washing agents against viruses and bacteria: experiments with rotavirus and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 12: 3113-3118
- Arista S., Vizzi E., Ferraro D., Cascio A., Di Stefano R. 1997. Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. *Archives of Virology*, 142: 2065-2071
- Arista S., Vizzi E., Migliore M. C., Di Rosa E., Cascio A. 2003. High incidence of G9P[8] rotavirus infections in Italian children during the winter season 1999-2000. *European Journal of Epidemiology*, 18: 711-714
- Bányai K., Bogdán A., Kisfali P., Molnár P., Mihály I., Melegh B., Martella V., Gentsch J. R., Szücs G. 2007. Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 6: 916-919
- Bányai K., Gentsch J. R., Glass R. I., Új M., Mihály I., Szücs G. 2004a. Eight year survey of human rotavirus strain demonstrates circulation of unusual G and P types in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, 42,1: 393-397

- Bányai K., Gentsch J. R., Schipp R., Jakab F., Bene J., Melegh B., Glass R. I., Szücs G. 2004b. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 791-801
- Bányai K., Gentsch J. R., Schipp R., Jakab F., Meleg E., Mihály I., Szücs G. 2005. Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *Journal of Medical Virology*, 76: 414-423
- Bányai K., Martella V., Jakab F., Melegh B., Szücs G. 2004. Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 9: 4338-4343
- Bishop R. F., Davidson G. P., Holmes I. H., Ruck B. J. 1973. Evidence for viral gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 289: 1096-1097
- Carlson J. A., Middleton P. J., Szymanski M. T., Huber J., Petric M. 1978. Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *American Journal of Diseases of Children*, 132: 477-479
- Chandran A., Heinzen R. R., Santosham M., Siberry G., K. 2006. Nosocomial rotavirus infections: a systematic review. *Journal of Pediatrics*, 149: 441-447
- Cioc A. M., Nuovo G. J. 2002. Histologic and in situ viral findings in the myocardium in cases of sudden unexpected death. *Modern Pathology*, 9: 914-922
- Coulson B. S., Witterick P. D., Tan Y., Hewish M. J., Mountford J. N., Harrison L. C., Honeyman M. C. 2002. Growth of rotaviruses in primary pancreatic cells. *Journal of Virology*, 76: 9537-9544
- Cook S. M., Glass R. I., LeBaron C. W., Ho M. S. 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin of the World Health Organization*, 68, 2: 171-177

- De Grazia S., Ramirez S., Giammanco G. M., Colomba C., Martella V., Lo Biundo C., Mazzola R., Arista S. 2007. Diversity of human rotaviruses detected in Sicily, Italy, over a 5-year period (2001-2005). *Archives of Virology*, 152: 833-837
- Dennehy P. H. 2007. Rotavirus vaccines-An update. *Vaccine*, 25, 16: 3137-3141
- Desselberger U. 1999. Rotavirus infections: guidelines for treatment and prevention. *Drugs*, 58: 447-452
- Desselberger U., Gray J. 2005. Viral gastroenteritis. *Medicine*, 33, 4: 78-81
- Desselberger U., Wolleswinkel-van den Bosch J., Mrukowicz J., Rodrigo C., Giaquinto C., Vesikari T. 2006. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 25, Suppl 1: S30-S41
- Estes M. K. 1990. Rotaviruses and their replication. V: *Virology*. 2<sup>nd</sup> ed. Fields B. N., Knipe D. M. et al. (eds.). New York, Raven Press: 1333-1333
- Estes M. K. 1996a. Rotaviruses and their replication. V: *Fields virology*. 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 2. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. (eds.). Philadelphia, Lippincott – Raven Publishers: 1625-1655
- Estes M. K. 1996b. Rotaviruses and their replication. V: *Fields virology*. 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 2. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. (eds.). Philadelphia, Lippincott – Raven Publishers
- <http://web.inonu.edu.tr/~bdurmaz/Reovirusrota.htm> (avgust 2007): 1 str.
- Estes M. K., Choen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*, 53, 4: 410-449
- Frühwirth M., Brösl S., Ellemunter H., Moll-Schüler I., Rohwedder A., Mutz I. 2000. Distribution of rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes among nonhospitalized and hospitalized patients with gastroenteritis and patients with nosocomially acquired gastroenteritis in Austria. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 5: 1804-1806

- Furuya Y., Katayama T., Miyahara K., Kobayashi A., Funabiki T. 2007. Detection of the Rotavirus A genome from the cerebrospinal fluid of a gastroenteritis patient: A case report. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60: 148-149
- Gentsch J. R., Glass R. I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., Das B. K., Bhan M. K., 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 6: 1365-1373
- Gentsch J. R., Woods P. A., Ramachandran M., Das B. K., Leite J. P., Alfieri A., Kumar R., Bhan M. K., Glass R. I. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *Journal of Infectious Diseases*, 174,1: 30-36
- Gouvea V., Glass R. I., Woods P., Taniguchi K., Clark H. F., Forrester B., Fang Z-J. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 2: 276-282
- Holmes J. L., Kirkwood C. D., Gerna G., Clemens J. D., Rao M. R., Naficy A. B., Abu-Elyazeed R., Savarino S. J., Glass R. I., Gentsch J. R. 1999. Characterisation of unusual G8 rotavirus strains isolated from Egyptian children. *Archives of Virology*, 144: 1381-1396
- Honma S., Chizhikov V., Santos N., Tatsumi M., Timenetsky M. S. T., Linhares A. C., Mascarenhas J. P., Ushijima H., Armah G. E., Gentsch J. R., Hoshino Y. 2007. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 8: 2641-2648
- ICTVdb Management. 2006. Rotavirus. V: ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond C. (ed.). New York, Columbia University  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/> (avgust 2007): 1 str.



Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. 2006a. Okužbe in cepljenje proti rotavirusom, vprašanja in odgovori. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Center za nalezljive bolezni, Oddelek za program cepljenja [http://www.ivz.si/javne\\_datoteke/datoteke/1127-Okužbe\\_in\\_cepljenje\\_proti\\_rotavirusom\\_letak.pdf](http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/1127-Okužbe_in_cepljenje_proti_rotavirusom_letak.pdf) (avgust 2007): 2 str.

Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. 2006b. Rotavirusne okužbe v Sloveniji od leta 1998, po mesecih. V: Rotavirusne okužbe v Sloveniji v letu 2006. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Center za nalezljive bolezni <http://www.ivz.si/> (avgust 2007), 1 str.

Iturriza-Gómara M., Cubitt D., Desselberger U., Gray J. 2001. Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3796-3798

Iturriza-Gómara M., Desselberger U., Gray J. 2003. Molecular epidemiology of rotaviruses: Genetic mechanisms associated with diversity. V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 9-21

Iturriza-Gómara M., Green J., Brown D. W., Desselberger U., Gray J. J. 2000. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 898-901

Kapikian A. Z., Chanock R. M. Rotaviruses. V: *Fields virology*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 2. Fields B. N., Knipe D. M., Howlery P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. (eds.). New York, Raven Press: 1353-3529

Marin J. 2002. Neposredno dokazovanje virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 109-118

Lorrot M., Vasseur M. 2007. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea. *Virology Journal*, 4: 31 <http://www.virologyj.com/content/4/1/31> (avgust 2007): 6 str.

- Lundgren O., Svensson L. 2001. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection*, 3: 1145-1156
- Lužnik Bufon T., Poljšak Prijatelj M., Kuret J., Prevec M. 1999. Nozokomialni prenos rotavirusov. V: Bolnišnične okužbe: zbornik predavanj. Strokovno srečanje Bolnišnične okužbe, Maribor, 21. in 22. maj 1999. Dragaš A. Z., Lorenčič Robnik S., Kotnik Kotnik Kevorkijan B. (ur.). Maribor, Splošna bolnišnica: 287-293
- Lynch M., Lee B., Azimi P., Gentsch J., Glaser C., Gilliam S., Chang H. G-H., Ward R., Glass R. I. 2001. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 932-938
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. New York, Pearson Education: 832-844
- Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 20: 333-338
- Martella V., Terio V., Arista S., Elia G., Corrente M., Madio A., Pratelli A., Tempesta M., Cirani A., Buonavoglia C. 2004. Nucleotide variation in the VP7 gene affects PCR genotyping of G9 rotaviruses identified in Italy. *Journal of Medical Virology*, 72: 143-148
- Martella V., Ciarlet M., Bányai K., Lorusso E., Cavalli A., Corrente M., Elia G., Arista S., Camero M., Desario C., Lavazza A., Buonavoglia C. 2006. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*, 346: 301-311
- Matthijnssens J., Rahman M., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Kabue J.-P., Tamfum Muyembe J.-J., Van Ranst M. 2006. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 5: 1801-1809

- Miller S. E. 1997. Use of electron microscopy to diagnose viral illnesses. *Annals of Saudi Medicine*, 17, 1: 66-76
- Nakagomi O., Nakagomi T. 1991. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Archives of Virology*, 120, 1-2: 43-55
- Parashar U. D., Alexander J. P., Glass R. I. 2006. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations and reports. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention 55 (RR12): 1-13.  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5512a1.htm> (september 2006): 23 str.
- Parashar U. D., Bresee J. S., Gentsch J. R., Glass R. I. 1998. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 4: 561-70
- Parashar U. D., Glas R. I. 2003. Viral causes of gastroenteritis. V: *Viral gastroenteritis*. Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 9-21
- Parashar U. D., Hummelman E. G., Bresee J. S., Miller M. A., Glass R. I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 5: 565-72.
- Poljšak-Prijatelj M., Steyer A., Zimšek Mijovski J. 2005. Molekularna diagnostika virusnih gastroenteritisov. V: *Molekularna diagnostika v medicini: zbornik predavanj*. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Milčinskega, XXXVI. Memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika, I. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo, Letno srečanje sekcije za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije slovenskega zdravniškega društva, Ljubljana, 30. november - 2. december 2005. Luzar B, Poljak M., Glavač D., Balažič J. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 387-391
- Rahman M., Matthijnssens J., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Taniguchi K., Iturriza-Gómara M., Iftekharuddin N., Azim T., Van Ranst M. 2007. Evolutionary history and global

spread of the emerging G12 human rotaviruses. *Journal of Virology*, 81, 5: 2382-2390

Rahman M., Matthijnsens J., Nahar S., Podder G., Sack D. A., Azim T., Van Ranst M. 2005. Characterisation of a novel P[25],G11 human group A rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 7: 3208-3212

Ramig R. F. 1997. Genetics of the rotaviruses. *Annual Reviews of Microbiology*, 51: 225-255

Ramig R. F. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*, 78, 19: 10213-10220

Riepenhoff-Talty M., Goueva V., Evans M. J., Svensson L., Hoffenberg E., Sokol R. J., Uhnoo I., Greenberg S. J., Schakel K., Zhaori G., Fitzgerald J., Chong S., El-Yousef M., Nemeth A., Brown M., Piccoli D., Hyans J., Ruffin D., Rossi T. 1996. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *Journal of Infectious Diseases*, 174: 8-15

Samajdar S., Varghese V., Barman P., Ghosh S., Mitra U., Dutta P., Bhattacharya S. K., Narasimham M. V., Panda P., Krishnan T., Kobayashi N., Naik T. N. 2006. Changing pattern of human group A rotaviruses: emergence of G12 as an important pathogen among children in eastern India. *Journal of Clinical Virology*, 36: 183-8

Silvestri L. S., Taraporewala Z. F., Patton J. T. 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *Journal of Virology*, 78, 14: 7763-7774

Singelton P., Sainsbury D. 2001. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons Ltd.: 261-264, 266-267

Steyer A. 2002. Genotipi G in P rotavirusov skupine A v Sloveniji v letih 1988 do 1994. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 51 str.

- Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Barlic-Maganja D., Bufon T., Marin J. 2005a. The emergence of rotavirus genotype G9 in hospitalized children in Slovenia. *Journal of Clinical Virology*, 33: 7-11
- Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Lužnik Bufon T., Marin J. 2005b. Rotavirus genotypes in Slovenia between 1988-2003 (Rotavirusni genotipi v Sloveniji med leti 1988-2003). V: *Molekularna diagnostika v medicini: zbornik predavanj*. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Milčinskega, XXXVI. Memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika, I. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo, Letno srečanje sekcije za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije slovenskega zdravniškega društva, Ljubljana, 30. november - 2. december 2005. Luzar B, Poljak M., Glavač D., Balažic J. (ur.). Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 474
- Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Bufon T., Sedmak M., Vidmar L., Zimšek Mijovski J., Marin J. 2006. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *Journal of Medical Virology*, 9999: 1-6
- Steyer A, Poljšak-Prijatelj M., Lužnik Bufon T., Marčun-Varda N., Marin J. 2007a. Rotavirus genotypes in Slovenia: unexpected detection of G8P[8] and G12P[8] genotypes. *Journal of Medical Virology*, 79: 626-632
- Steyer A. 2007b. Genetske značilnosti in filogenetska primerjava človeških in živalskih rotavirusnih genotipov. Doktorsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 86 str.
- Taniguchi K., Urasawa T., Kobayashi N., Gorziglia M., Urasawa S. 1990. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *Journal of Virology*, 64, 11: 5640-5644.
- Taraporewala Z. F., Patton J. T. 2004. Nonstructural proteins involved in genome packing and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Research*, 101: 57-66

- Tcheremenskaia O., Marucci G., De Petris S., Ruggeri F. M., Dovecar D., Sternak S. L., Matyasova I., Dhimolea M. K., Mladenova Z., Fiore L., rotavirus study group. 2007. Molecular epidemiology of rotavirus in central and southeastern Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 7: 2197-2204
- Torres-Vega M. A., Gonzáles R. A., Duarte M., Poncet D., López S., Arias C. F. 2000. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerisation, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *Journal of General Virology*, 81: 821-830
- Ward R. L., Knowlton D. R., Greenberg H. B. 1988a. Phenotypic mixing coinfection of cells with two strains of human rotavirus. *Journal of Virology*, 62, 11: 4358-4361
- Ward R. L., Knowlton D. R., Hurst P-F. L. 1988b. Reassortant formation and selection following coinfection of cultured cells with subgroup 2 human rotaviruses. *Journal of General Virology*, 69: 149-162

## **ZAHVALA**

Za strokovno pomoč pri nastajanju diplomskega dela se zahvaljujem delovni mentorici strok. svet. dr. Mateji Poljšak-Prijatelj, mentorici prof. dr. Tatjani Avšič-Županc, recenzentu prof. dr. Srečku Korenu in predsednici komisije prof. dr. Darji Žgur Bertok.

Za pomoč pri izvedbi diplomskega dela se zahvaljujem strok. svet. dr. Mateji Poljšak-Prijatelj, asist. dr. Andreju Steyerju in teh. delavki Ireni Šest.

Zahvaljujem se staršem, ki so mi omogočili študij in me podpirali med mojim celotnim izobraževanjem.

Hvala vsem!

## **PRILOGE:**

- **Priloga A.** Osnovni podatki vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok in rezultati pomnoževanja odsekov gena G in gena P, genotipizacije, poskusnega komercialnega kompleta Rotavirus 280 in sekvenciranja; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.
- **Priloga B.** Pogostost posameznih G in genotipov P; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.
- **Priloga C.** Pogostost genotipov; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.



**Priloga A.** Osnovni podatki vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok in rezultati pomnoževanja odsekov gena G in gena P, genotipizacije, poskusnega komercialnega kompleta Rotavirus 280 in sekvenciranja; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

Številka vzorca	Datum prevzema	Spol	Starost (meseči)	EM	ELISA	RT-PCR G	RT-PCR P	Genotip G	Genotip P	Rotavirus 280	Sekvenciranje
2413/05	1.12.2005	M	38	+	+	-	+	-	P[8]	+	
2423/05	2.12.2005	Ž	13	+	-	+	+	G1	P[8]	+	
2425/05	2.12.2005	M	6	+	+	+	+	G1	P[8]	+	
2426/05	2.12.2005	Ž	7	+	+	+	+	G1	P[8]	+	
2433/05	3.12.2005	M	49	+	+	nespecifičen	+	G2	P [14]*	+	←
2442/05	5.12.2005	Ž	31	+	+	+	+	G9	P[8]	+	
2444/05	5.12.2005	M	47	+	+	+	+	G9	P[8]	+	
2445/05	5.12.2005	Ž	21	+	+	+	+	G1	P[8]		
2454/05	6.12.2005	Ž	25	+	+	+	+	G1	P[8]		
2455/05	6.12.2005	Ž	20	+	+	+	+	G4	P[8]		
2464/05	7.12.2005	Ž	14	+	+	+	+	G9	P[8]		
2475/05	9.12.2005	M	38	+	+	+	+	G9	P[8]		
2480/05	9.12.2005	Ž	18	+	+	+	+	G1	P[8]	šibko +	
2485/05	10.12.2005	Ž	18	+	+	+	+	G9	P[8]		
2486/05	10.12.2005	M	23	+	+	+	+	G12*	P[8]		←
2488/05	10.12.2005	M	49	+	+	+	+	G1	P[8]		
2490/05	10.12.2005	Ž	5	+	+	+	+	G1	P[8]		
2491/05	10.12.2005	Ž	21	+	+	+	+	G1	P[8]	+	
2493/05	12.12.2005	Ž	15	+	+	+	+	G1	P[8]	+	
2494/05	12.12.2005	M	63	+	+	+	+	G1	P[8]	+	
2502/05	13.12.2005	M	11	+	+	+	+	G9	P[8]		
2509/05	13.12.2005	M	55	+	+	+	+	G9	P[8]		

...se nadaljuje...

... nadaljevanje **Priloga A.** Osnovni podatki vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok in rezultati pomnoževanja odsekov gena G in gena P, genotipizacije, poskusnega komercialnega kompleta Rotavirus 280 in sekvenciranja; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

Številka vzorca	Datum prevzema	Spol	Starost (meseči)	EM	ELISA	RT-PCR G	RT-PCR P	Genotip G	Genotip P	Rotavirus 280	Sekvenciranje
2526/05	15.12.2005	M	23	+	+	+	+	G1	P[8]		
2538/05	17.12.2005	M	7	+	+	-	-	G1	P[8]	+	
2541/05	17.12.2005	Ž	12	+	+	+	+	G1	P[8]		
2543/05	17.12.2005	M	42	+	+	+	+	G1	P[8]		
2547/05	19.12.2005	M	37	+	+	+	+	G1	P[8]		
2549/05	19.12.2005	Ž	12	+	+	+	+	G1	P[8]	+	
2552/05	19.12.2005	M	45	+	+	+	+	G1	P[8]		
2554/05	19.12.2005	M	9	+	+	+	+	G1	P[8]		
2557/05	20.12.2005	Ž	18	+	+	+	+	G1	P[8]		
2561/05	20.12.2005	Ž	8	+	+	-	+	G2	P[4]	+	
2566/05	20.12.2005	M	10	+	+	-	-	G1	P[8]	šibko +	
2572/05	21.12.2005	M	18	+	+	+	+	G1	P[8]		
2573/05	21.12.2005	M	13	+	+	+	+	G1	P[8]		
2581/05	22.12.2005	M	19	+	+	+	+	G1	P[8]		
2582/05	23.12.2005	M	49	+	+	+	+	G1	P[8]		
2584/05	23.12.2005	Ž	14	+	+	+	+	G1	P[8]		
2586/05	23.12.2005	M	45	+	+	+	+	G1	P[8]		
2587/05	23.12.2005	M	11	+	+	+	+	G1	P[8]		
2588/05	23.12.2005	M	25	+	+	+	+	G1	P[8]		
2593/05	24.12.2005	Ž	17	+	+	+	+	G1	P[8]		
2594/05	24.12.2005	M	9	+	+	+	+	G1	P[8]		
2595/05	24.12.2005	Ž	26	+	+	+	+	G1	P[8]		
2596/05	24.12.2005	Ž	18	+	+	+	+	G1	P[8]		

...se nadaljuje...

... nadaljevanje **Priloga A.** Osnovni podatki vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok in rezultati pomnoževanja odsekov gena G in gena P, genotipizacije, poskusnega komercialnega kompleta Rotavirus 280 in sekvenciranja; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

Številka vzorca	Datum prevzema	Spol	Starost (meseči)	EM	ELISA	RT-PCR G	RT-PCR P	Genotip G	Genotip P	Rotavirus 280	Sekvenciranje
2597/05	24.12.2005	M	43	+	+	+	+	G1	P[8]		
2603/05	27.12.2005	M	25	+	+	+	+	G1	P[8]		
2607/05	27.12.2005	Ž	55	+	+	+	+	G1	P[8]		
2608/05	27.12.2005	Ž	14	+	+	+	+	G1	P[8]		
2609/05	27.12.2005	Ž	43	+	+	+	+	G1,G3	P[8]		
2610/05	27.12.2005	M	41	+	+	+	+	G1	P[8]		
2612/05	27.12.2005	Ž	53	+	+	+	+	G1	P[8]		
2613/05	27.12.2005	Ž	65	+	+	+	+	G1	P[8]		
2614/05	27.12.2005	Ž	35	+	+	+	+	G1	P[8]		
2615/05	27.12.2005	Ž	26	+	+	+	+	G1	P[8]		
2616/05	27.12.2005	Ž	41	+	+	+	+	G1	P[8]		
2618/05	27.12.2005	Ž	21	+	+	+	+	G1	P[8]		
2619/05	27.12.2005	Ž	31	+	+	+	+	G1	P[8]		
2620/05	27.12.2005	Ž	3	+	+	+	+	G1	P[8]		
2621/05	27.12.2005	Ž	14	+	+	+	+	G1	P[8]		
2624/05	28.12.2005	M	21 dni	+	+	+	+	G1	P[8]		
2625/05	28.12.2005	Ž	23	+	+	+	+	G1	P[8]		
2628/05	28.12.2005	Ž	43	+	+	+	+	G1	P[8]		
2629/05	29.12.2005	M	53	+	+	+	+	G1	P[8]		
2632/05	30.12.2005	Ž	30	+	+	+	+	G1	P[8]		
2633/05	30.12.2005	Ž	1	+	+	+	+	G1	P[8]		
2634/05	30.12.2005	M	35	+	+	+	+	G1	P[8]		
2635/05	30.12.2005	Ž	18	+	+	+	+	G1	P[8]		

...se nadaljuje...

... nadaljevanje **Priloga A**. Osnovni podatki vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok in rezultati pomnoževanja odsekov gena G in gena P, genotipizacije, poskusnega komercialnega kompleta Rotavirus 280 in sekvenciranja; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

Številka vzorca	Datum prevzema	Spol	Starost (meseči)	EM	ELISA	RT-PCR G	RT-PCR P	Genotip G	Genotip P	Rotavirus 280	Sekvenciranje
2636/05	30.12.2005	M	35	+	+	+	+	G1	P[8]		
2637/05	30.12.2005	M	15	+	+	+	+	G1	P[8]		
2638/05	30.12.2005	M	49	+	+	+	+	G1	P[8]		
2639/05	31.12.2005	Ž	14	+	+	+	+	G1	P[8]		
2642/05	31.12.2005	Ž	98	+	+	+	+	G1	P[8]		
2643/05	31.12.2005	M	20	+	-	+	+	G1	P[8]		
2644/05	31.12.2005	Ž	21	+	+	+	+	G1	P[8]		
2645/05	31.12.2005	Ž	69	+	+	+	+	G1	P[8]		
2647/05	31.12.2005	M	ni datuma rojstva	+	+	+	+	G1	P[8]		
2648/05	31.12.2005	Ž	ni datuma rojstva	+	+	+	+	G9,G3	P[8]		
2649/05	31.12.2005	M	20	+	+	+	+	G1	P[8]		
7/06	3.1.2006	Ž	12	+	+	+	+	G1	P[8]		
8/06	3.1.2006	M	25	+	+	+	+	G1	P[8]		
13/06	3.1.2006	Ž	21	+	+	+	+	G9,G3	P[8]		
19/06	4.1.2006	M	5	+	+	+	+	G9*	P[8]		←
22/06	4.1.2006	Ž	40	+	+	+	+	G1	P[8]		
24/06	4.1.2006	M	29	+	+	+	+	G1	P[8]		
30/06	4.1.2006	M	16	+	+	+	+	G1	P[8]		
36/06	5.1.2006	M	39	+	+	+	+	G1	P[8]		
38/06	5.1.2006	M	15	+	+	+	+	G1	P[8]		
40/06	5.1.2006	M	13	+	-	+	+	G1	P[8]		
41/06	5.1.2006	M	20	-	+	-	-	G1	P[8]	šibko +	

...se nadaljuje...

... nadaljevanje **Priloga A**. Osnovni podatki vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok in rezultati pomnoževanja odsekov gena G in gena P, genotipizacije, poskusnega komercialnega kompleta Rotavirus 280 in sekvenciranja; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

Številka vzorca	Datum prevzema	Spol	Starost (mesece)	EM	ELISA	RT-PCR G	RT-PCR P	Genotip G	Genotip P	Rotavirus 280	Sekvenciranje
44/06	5.1.2006	Ž	48	+	+	+	+	G1	P[8]		
48/06	6.1.2006	M	7	+	+	+	+	G9	P[4]*	+	←
49/06	6.1.2006	M	33	+	+	+	+	G1	P[8]		
57/06	6.1.2006	M	32	+	+	+	+	G1	P[8]		
62/06	7.1.2006	Ž	43	+	-	-	-	G1	P[8]	+	
63/06	7.1.2006	Ž	45	+	+	+	+	G1	P[8]		
66/06	7.1.2006	Ž	30	+	+	+	+	G1	P[8]		
67/06	7.1.2006	M	11	+	+	+	+	G1	P[8]		
68/06	7.1.2006	M	16	+	+	+	+	G1	P[8]		
69/06	7.1.2006	Ž	19	+	+	+	+	G1	P[8]		

Legenda:

M Moški spol

Ž Ženski spol

+ Pomeni pozitiven rezultat.

- Pomeni negativen rezultat.

\* Pomeni, da smo genotip določili s sekvenciranjem.

← Pomeni, da smo sekvenciranje opravili pri tem vzorcu.

**Priloga B.** Pogostosti genotipov G in genotipov P; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

<b>G tipizacija</b>								
<b>Genotip</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G4</b>	<b>G9</b>	<b>G12</b>	<b>G1G3</b>	<b>G3G9</b>	<b>NT</b>
Število vzorcev (odstotki)	83 (83,0 %)	2 (2,0 %)	1 (1,0 %)	9 (9,0 %)	1 (1,0 %)	1 (1,0 %)	2 (2,0 %)	1 (1,0 %)

<b>P tipizacija</b>			
<b>Genotip</b>	<b>P[4]</b>	<b>P[8]</b>	<b>P[14]</b>
Število vzorcev (odstotki)	2 (2,0 %)	97 (97,0 %)	1 (1,0 %)

**Priloga C.** Pogostosti genotipov; Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 1. december 2005 - 7. januar 2006.

Podana so števila vzorcev, v oklepajih so odstotki.		G tipizacija							
		G1	G2	G4	G9	G12	G1G3	G3G9	NT
P tipizacija	P[8]	83 (83,0 %)	/	1 (1,0 %)	8 (8,0 %)	1 (1,0 %)	1 (1,0 %)	2 (2,0 %)	1 (1,0 %)
	P[4]	/	1 (1,0 %)	/	1 (1,0 %)	/	/	/	/
	P[14]	/	1 (1,0 %)	/	/	/	/	/	/

POPRAVKI



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ida KRALJ

**DOLOČANJE ROTAVIRUSNIH GENOTIPOV PRI  
HOSPITALIZIRANIH OTROCIH Z  
GASTROENTERITISOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007