

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sonja VESEL

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH DIAGNOSTIČNIH METOD PRI
DOLOČANJU KALICIVIRUSOV IZ IZTREBKOV BOLNIKOV
OBOLELIH ZA GASTROENTERITISOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sonja VESEL

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH DIAGNOSTIČNIH METOD PRI DOLOČANJU
KALICIVIRUSOV IZ IZTREBKOV BOLNIKOV OBOLELIH ZA GASTROENTERITISOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**COMPARISON OF DIFFERENT DIAGNOSTIC METHODS FOR DETECTION OF
CALICIVIRUSES FROM FECES OF PATIENS WITH GASTROENTERITIS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

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

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

Mentorica: prof.dr. Tatjana Avšič-Županc

Somentorica: asist.strok.svet.dr. Mateja Poljšak-Prijatelj

Recezent: doc.dr. Miroslav Petrovec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC

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

Član: asist.strok. svet. dr. Mateja POLJŠAK-PRIJATELJ

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

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sonja Vesel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 578.835.3 : 578.2 : 578.7 (043)=163.6
KG virusi/kalicivirusi/*Caliciviridae*/človeški norovirusi/gastroenteritis/določanje kalicivirusov/molekularne metode/RT-PCR v realnem času/ELISA
AV VESEL, Sonja
SA AVŠIČ-ŽUPANC Tatjana (mentorica)/ POLJŠAK-PRIJATELJ Mateja (somentorica)/ PETROVEC Miroslav (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN PRIMERJAVA RAZLIČNIH DIAGNOSTIČNIH METOD PRI DOLOČANJU KALICIVIRUSOV IZ IZTREBKOV BOLNIKOV OBOLELIH ZA GASTROENTERITISOM
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 45 str., 5 pregl., 12 sl., 79 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Norovirusi so v zadnjih letih prepoznani kot najpogostejši povzročitelji virusnega gastroenteritisa pri ljudeh. Namen naloge je bil ugotoviti kolikšen delež vzorcev, ki so bili po predhodnem testiranju z encimskoimunskim testom (ELISA) negativni, je pri testiranju z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času s predhodno transkripcijo (RT-PCR v realnem času) pozitivnih. Rezultati so pokazali, da pri testiranju vzorcev s testom ELISA izgubimo 18,32 % pozitivnih vzorcev. Ugotavljali smo tudi porazdelitev norovirusnih okužb po starosti preiskovanih bolnikov in bolnišnicah ter tako dodatno proučili pomen norovirusov pri nekaterih bolnikih z drugo resnejšo primarno boleznijo. Največ norovirusov smo dokazali v vzorcih poslanih iz Klinike za infekcijska in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Večina bolnikov je bila starejših od 15 let. Največji delež okužb je bil v mesecu decembru leta 2008. Preverjali smo tudi specifičnost in občutljivost dveh encimskoimunskih testov, IDEIA™ in RIDASCREEN® glede na »zlati standard« RT-PCR v realnem času. Občutljivost prve je bila 30,67 %, specifičnost 94,24 %, druge pa 50,00 % in specifičnost 95,60 %.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ŠD Dn
DK UDC 578.835.3 : 578.2 : 578.7 (043)=163.6
KG viruses/caliciviruses/*Caliciviridae*/human norovirus/gastroenteritis/detection of caliciviruses/molecular techniques/real time RT-PCR/ELISA
AV VESEL, Sonja
SA AVŠIČ-ŽUPANC Tatjana (supervisor)/ POLJŠAK-PRIJATELJ Mateja (co-advisor)/PETROVEC Miroslav (reviewer)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
LI 2009
IN COMPARISON OF DIFFERENT DIAGNOSTIC METHODS FOR DETECTION OF CALICIVIRUSES FROM FECES OF PATIENS WITH GASTROENTERITIS
TD Graduation Thesis (University studies)
OP IX, 45 p., 5 tab., 12 fig., 79 ref.
IJ sl
JI sl/en
AI Noroviruses are among the most common cause of viral gastroenteritis in children and adults all over the world. The aim of the study was to detect additional positive norovirus results using real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method in enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) norovirus negative samples. Our results showed that a portion of false negative samples represent 18.32 % of all investigated samples. The majority of norovirus positive stool samples were received from children with gastroenteritis hospitalized in the Clinic for Infectious Diseases, University Medical Center, Ljubljana. The incidence of norovirus related gastroenteritis peaked in December and was highest among patients older than 15 years, but it was also present in children younger than 5 years. Two ELISA tests (IDEA and RIDASCREEN) were compared against RT-PCR real time as golden standard. Our data showed the sensitivity and the specificity of ELISA IDEA[™] is 30.64% and 94.24% and of ELISA RIDASCREEN[®] 50 % and 95 % respectively.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA	3
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV	4
2.3 GENOM IN BELJAKOVINE	5
2.4 PATOGENEZA IN GOSTITELJEVA OBČUTLJIVOST NA OKUŽBO	7
2.5 BOLEZENSKI ZNAKI IN ZDRAVLJENJE	8
2.6 EPIDEMIOLOGIJA	8
2.7 DIAGNOSTIČNE METODE	9
2.7.1 Elektronska mikroskopija	9
2.7.2 Dokazovanje virusnih antigenov	10
2.7.3 Dokazovanje nukleinske kisline	11
2.7.3.1 Princip delovanja RT-PCR v realnem času	11
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Klinični material	15
3.1.2 Reagenti za osamitev RNA s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)	16
3.1.3 Reagenti za reakcijo RT-PCR v realnem času z encimskim kompletom AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit (Ambion)	16
3.1.4 Reagenti za encimsko imunski test IDEIA™ Norovirus (Oxoid)	17
3.1.5 Reagenti za encimsko imunski test RIDASCREEN® Norovirus (Biopharm)	17
3.1.6 Potrošni material	18
3.1.7 Laboratorijska oprema	18
3.2 METODE	18
3.2.1 Priprava in shranjevanje vzorcev iztrebkov	18
3.2.2 Osamitev RNA s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)	19
3.2.3 RT-PCR v realnem času	19
3.2.4 Izvedba encimsko imunskega testa IDEIA™ Norovirus (Oxoid)	22
3.2.5 Izvedba encimsko imunskega testa RIDASCREEN® Norovirus (Biopharm)	23
4 REZULTATI	25
4.1 REZULTATI VZORCEV TESTIRANIH Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU 25	
4.1.1 Značilnosti vzorcev, pozitivnih z metodo RT-PCR v realnem času	25
4.2 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA ELISA IDEIA™ Norovirus	28
4.3 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST TESTA ELISA RIDASCREEN®	28
5 RAZPRAVA	30

5.1	RT-PCR V REALNEM ČASU ZA PREVERJANJE NOROVIRUSNE RNA V VZORCIH, KI SO BILI PREDHODNO NEGATIVNI Z OBIČAJNIM TESTOM ELISA IDEIA™	31
5.2	OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA ELISA IDEIA™	33
5.3	OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA ELISA RIDASCREEN®	34
6	SKLEPI	36
7	POVZETEK	37
8	VIRI	38
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja in mesta prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov (Masaka in sod., 2005; Trottier in sod., 2006).....	17
Preglednica 2: Časovni in temperaturni potek RT-PCR v realnem času.	20
Preglednica 3: Rezultati RT-PCR v realnem času vzorcev iztrebkov, pri katerih smo predhodno izvedli test ELISA IDEIA™, vendar nismo določili norovirusnih antigenov.	25
Preglednica 4: Rezultati vzorcev iztrebkov pregledanih s testom ELISA IDEIA™ Norovirus in RT-PCR v realnem času.	28
Preglednica 5: Rezultati vzorcev iztrebkov pregledanih s testom ELISA in RT-PCR v realnem času.	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetsko drevo genskih skupin norovirusov. Narejeno je bilo na osnovi aminokislinskih zaporedij kapsidne beljakovine (Martella in sod., 2008).....	5
Slika 2: Genom norovirusov (KCDC, 2007).....	5
Slika 3: Kapsida, domeni S in P (Hutson in sod., 2004).....	6
Slika 4: Prikaz delovanja RT-PCR v realnem času z uporabo Taqman sonde (Real time PCR, 2003). a) Taqman sonda z vezanim fluoroforom na 5` koncu in dušilec na 3` koncu, b) sonda prepozna specifično zaporedje in se nanj veže, c) Taq polimeraza med reakcijo podal podaljševanja verige doseže in razgradi sondo, tako da dušilec in fluorofor nista več povezana.	13
Slika 5: Prikaz krivulje pomnoževanja nukleinske kisline (ICMG, 2009).	14
Slika 6: Prikaz pozitivnega rezultata na prisotnost norovirusne RNA z aparatom StepOneTM (Applied Biosystems).....	21
Slika 7: Prikaz negativnega rezultata na prisotnost norovirusne RNA z aparatom StepOneTM (Applied Biosystems).....	22
Slika 8: Encimsko imunski test – »sendvič metoda« (Biosystem Development, 2007).	23
Slika 9: Encimsko imunski test s kompleksom biotin-streptavidin-peroksidaza (Bender MedSystems, 2007).....	24
Slika 10: Razporeditev pozitivnih vzorcev bolnikov obolelih za okužbo z norovirusi po pošiljateljih v obdobju od novembra 2008 do februarja 2009.	26
Slika 11: Število obolelih za okužbo z norovirusi glede na starost obdobju od novembra 2008 do februarja 2009.	27
Slika 12: Razporeditev pozitivnih vzorcev bolnikov obolelih za okužbo z norovirusi v obdobju od novembra 2008 do februarja 2009.	27

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

cDNA	-komplementarna DNA (ang.: complementary DNA)
Da	-Dalton
DNA	-deoksiribonukleinska kislina (ang.: deoxyribonucleic acid)
ddH ₂ O	-demineralizirana destilirana voda
ELISA	-encimskoimunski test (ang.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FRET	- fluorescenčni prenos resonančne energije
GGI	-genska skupina I (ang.: genogroup I)
GGII	-genska skupina II
GGIII	-genska skupina III
GGIV	-genska skupina IV
GGV	-genska skupina V
ICTV	-Mednarodno združenje za taksonomijo virusov (ang.: International Committee on Taxonomy of Viruses)
ORF	-odprt bralni okvir (ang.: open reading frame)
RT-PCR	-verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo
RNA	-ribonukleinska kislina (ang.: Ribonucleic acid)
SRSV	-mali okrogli strukturirani virusi (ang.: small round structured viruses)
<i>Taq</i>	- <i>Thermus aquaticus</i>
VES	-vezikularni eksantem pri prašičih (ang.: vesicular exanthema of swine)

1 UVOD

Kaliciviruse so prvič zabeležili leta 1932, ko je prišlo do nenadnega izbruha boleznih vezikularnega eksantema pri prašičih v Kaliforniji (ang.: VES-vesicular exanthema of swine) (Smith in sod., 2004).

Družino *Caliviridae* sestavljajo majhni virusi brez ovojnice, z enovijačno RNA (L'Homme in sod., 2009). Glede na njihovo morfologijo in genomsko strukturo jih delimo v štiri rodove. Človeške kaliciviruse predstavljata rodova *Norovirus* in *Sapovirus*, pogosta povzročitelja izbruhov akutnega virusnega gastroenteritisa pri ljudeh (Lopman in sod., 2002). Norovirusi povzročajo izbruhe gastroenteritisa pri vseh starostnih skupinah (Billgren in sod., 2002). Izbruhi so bolj pogosti v zimskih mesecih (De Bruin in sod., 2006). Inkubacijska doba virusa je 12 do 48 ur, bolezen pa navadno traja od enega do treh dni. Bolezen običajno spremljajo različni bolezenski znaki, kot so bruhanje s trebušnimi krči, driska, glavobol in povišana telesna temperatura (Rabenau in sod., 2003). Okužba z norovirusi lahko poteka tudi asimptomatsko, okužena oseba pa lahko v takem primeru okužbo prenaša dalje. Virus se širi z neposrednim stikom ali pa posredno z onesnaženo hrano, vodo in aerosoli (Garcia in sod., 2006).

Noroviruse določamo z različnimi diagnostičnimi metodami, kot so: antigenski encimskoimunski testi (ELISA), elektronska mikroskopija in v zadnjem času verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) v realnem času. Vse bolj se namreč pojavlja potreba po hitri diagnostiki povzročiteljev virusnega gastroenteritisa. Kljub temu se še vedno najpogosteje uporabljajo encimskoimunski testi, katerih problem je v nižji občutljivosti (Rabenau in sod., 2003). Pri uporabi elektronske mikroskopije pa se srečujemo s problemom prenizke občutljivosti metode, saj je potrebna visoka koncentracija virusnih delcev – 10^6 virusnih delcev na ml iztrebka (Doane, 1994). Z metodo RT-PCR v realnem času določimo virusno RNA že v nekaj urah, z izbiro primernih začetnih oligonukleotidov in sond pa lahko istočasno določamo tudi genske skupine oz. genotipe kalicivirusov (Class in sod., 2007).

1.1 NAMEN

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti kolikšen delež vzorcev, ki so bili po predhodnem testiranju z encimskoimunskim kompletom IDEIATM (Oxoid, Cambridge, Velika Britanija) negativni, je pri testiranju z RT-PCR v realnem času pozitivnih. Ugotavljali smo tudi porazdelitev norovirusnih okužb po starosti bolnikov in na bolnišničnih oddelkih in tako dodatno proučili pomen norovirusov pri nekaterih bolnikih z drugo resnejšo primarno boleznijo. Preverjali smo tudi specifičnost in občutljivost dveh komercialnih kompletov ELISA, IDEIATM ter RIDASCREEN[®] (Biopharm, Darmstadt, Nemčija) v primerjavi z metodo RT-PCR v realnem času kot »zlati standard«.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA

Simptome gastroenteritisa je prvič opisal Zahorsky leta 1929 (Cubitt in sod., 1979). V jesenskem in zimskem obdobju med letoma 1946-47 je prišlo v javnih ustanovah v New Yorku do številnih izbruhov gastroenteritisa. Povzročitelja okužb niso uspeli odkriti (Gordon in sod., 1947). Leta 1968 je prišlo med učenci in učitelji šole v mestecu Norwalk (Ohio) do izbruha akutnega gastroenteritisa. Ugotovili so, da je povzročitelj najverjetneje majhen in na vročino odporen virus. Poskušali so ga gojiti v celični ali kakšni drugi tkivni kulturi, vendar neuspešno (Atmar in Estes, 2001).

Z metodo neposredne elektronske mikroskopije so leta 1972 odkrili 27 nm velik virus (Kapikian in sod., 1972). Kasneje so ugotovili, da so bili za izbruhe odgovorni tudi drugi mali okrogli strukturirani virusi (SRSV oz. ang.: small round structured viruses), ki so bili morfološko podobni virusom Norwalk (Appleton in sod., 1977; Dolin in sod., 1982). Od takrat dalje so uporabljali elektronsko mikroskopijo kot primarno diagnostično metodo za odkrivanje enteritičnih virusov (Caul in sod., 1996a).

Viruse Norwalk in ostale majhne okrogle viruse so glede na morfološke značilnosti opažene z elektronskim mikroskopom sprva uvrščali med pikornaviruse (Kapikian in sod., 1972). Leta 1976 so prvič opisali morfološko značilne kaliciviruse v iztrebkih otrok. Ker pa vsi otroci niso imeli bolezenskih znakov, niso mogli sklepati o virusni patogenosti (Atmar in Estes, 2001). V naslednjih letih so kaliciviruse le povezali z mnogimi izbruhi gastroenteritisov (McSwiggan in sod., 1978; Chiba in sod., 1979; Cubitt in sod., 1979; Chiba in sod., 1980; Cubitt in sod., 1980).

Leta 1981 so predlagali uvrstitev virusov Norwalk z enojno strukturo beljakovino z molekularno maso 59 kDa v samostojno družino (Greenberg in sod., 1981). Devet let pozneje, so dokazali, da imajo virusi Norwalk pozitivno usmerjeno, enovijačno, poliadenilirano RNA in jih tako uvrstili med kaliciviruse (Jiang in sod., 1993). Boljše razumevanje taksonomije in vedno večji napredek v razvoju molekularnih metod so leta 1993 vodili do objave celotnega nukleotidnega zaporedja genoma virusov Norwalk

(Lambden in sod., 1993). Viruse Norwalk in njim podobne viruse so pred nekaj leti preimenovali v noroviruse (Green in sod., 2000). Jiang je leta 1992 prvi uspel pomnožiti noroviruse z verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR), in od takrat dalje je to postala zelo uporabna in natančna diagnostična metoda (Jiang in sod., 1992a). Kasneje so sledile še številne izboljšave in napredki, predvsem razvoj verižne reakcije s polimerazo v realnem času (Espy in sod., 2006).

2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Leta 1979 so v Tretjem poročilu Mednarodnega združenja za taksonomijo virusov (ICTV) prvič omenili novo družino *Caliciviridae* (Green in sod., 2000). Ime kalici izvira iz latinske besede *calix*, kar pomeni čaša in označuje 32 čašastih vdolbinic na površini virusov (Berke in Matson , 2000). Viruse so v to družino združevali glede na naslednje značilnosti:

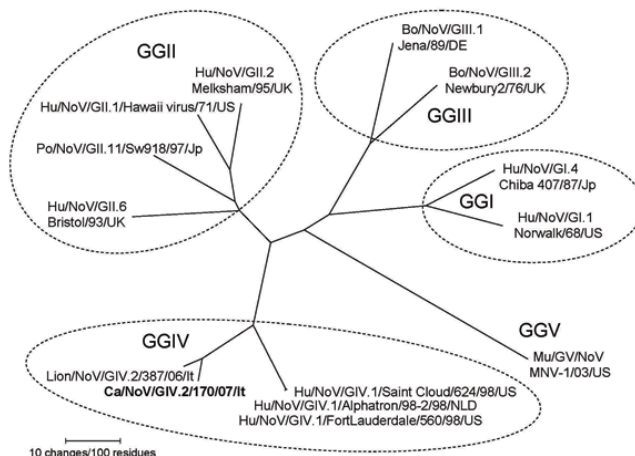
- prisotnost strukturne beljakovine, iz katere je zgrajena kapsida z 32 čašastimi vdolbinicami na površini,
- odsotnost metilirane skupine na 5' koncu RNA,
- prisotnost majhne beljakovine, ki je vezana na RNA in je odgovorna za infektivnost virusa (Black in sod., 1978; Burroughs in sod., 1978).

Virusi iz družine *Caliciviridae* so danes razvrščeni v štiri rodove:

- *Vesivirus* (referenčni sev: VESV, virus vezikularnega eksantema prašičev),
- *Lagovirus* (referenčni sev: RHDV, virus kunčje hemoragične bolezni),
- *Sapovirus* (referenčni sev: virus Sapporo),
- *Norovirus* (referenčni sev: virus Norwalk).

Človeške kaliciviruse predstavljata rodova *Sapovirus* in *Norovirus*, medtem ko vezivirusi in lagovirusi povzročajo okužbe pri živalih (Medici in sod., 2005). Noroviruse delimo v pet genskih skupin, ki jih označujemo z GI, GII, GIII, GIV in GV. Genske skupine GI, GII in GIV povzročajo gastroenteritis pri ljudeh. V GII so uvrščeni tudi nekateri prašičji norovirusi. Genski skupini GIII in GV pa najdemo pri govedu in miših. Pri ljudeh so najpogostejši povzročitelji okužb virusi genskih skupin GI in GII, ki se nadalje delita v 15

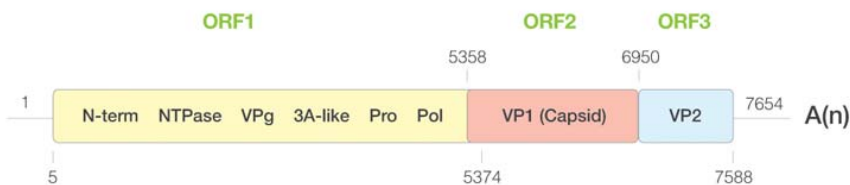
oz. 18 genotipov (GI/1 do GI/15 in GII/1 do GII/18) (Wang in sod., 2005; Shiota in sod., 2007).



Slika 1: Filogenetsko drevo genskih skupin norovirusov. Narejeno je bilo na osnovi aminokislinskih zaporedij kapsidne beljakovine (Martella in sod., 2008).

2.3 GENOM IN BELJAKOVINE

Genom človeških kalicivirusov je pozitivno polarna, na 3' koncu poliadenilirana, enovijačna molekula RNA. Dolžina genoma je približno 7600 nukleotidov (Atmar in Estes, 2001). Norovirusna RNA ima tri odprte bralne okvirje (ang. ORF: Open reading frame): ORF1, ORF2 in ORF3 (Castilho in sod., 2006).

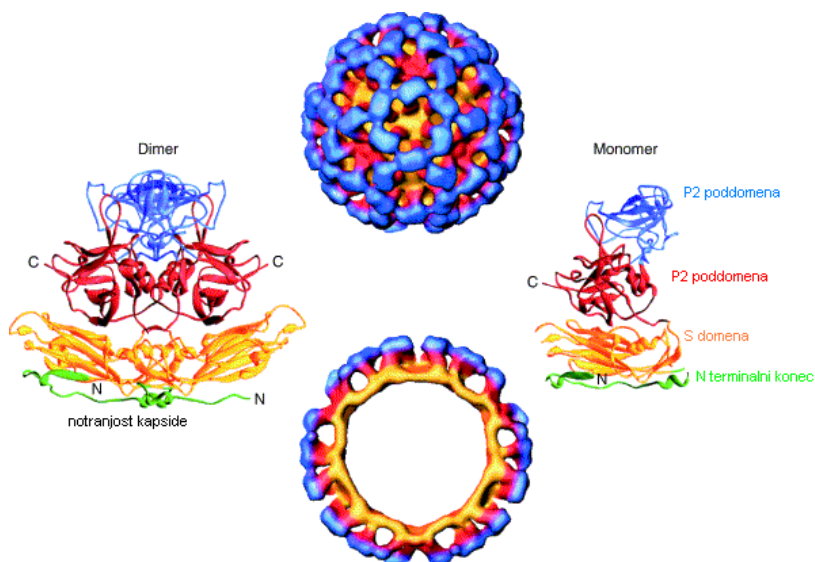


Slika 2: Genom norovirusov (KCDC, 2007).

ORF1 leži na 5' koncu genoma in kodira polipeptidno molekulo, dolgo 1738 aminokisljin z molekularno maso 193,5 kDA. Ima ohranjene regije aminokisljin, ki kažejo podobnost z beljakovinami pikornavirusov - z 2C helikazo, 3C proteazo in 3D od RNA odvisno RNA polimerazo (Atmar in Estes, 2001). Proteinaza razcepi polipeptid v nestrukturne beljakovine s helikazno in proteazno aktivnostjo ter aktivnostjo od RNA odvisne RNA polimeraze (Belliot in sod., 2003).

ORF2 kodira 530 aminokislin dolgo kapsidno beljakovino VP1 z molekularno maso, $M = 60$ kDa, ki je v ikozaedrični strukturi urejena v obliki dimerov. Odgovorna je za vezavo na gostiteljeve receptorje ter določa antigenske lastnosti virusov. Vsak dimer VP1 sestavlja domena S, ki tvori osnovo ikozaedične kapside, in domena P, ki tvori izbočen del kapside. Domena P je sestavljena iz poddomen P1 in P2 (slika 3). P2 je najbolj variabilna regija kapsidne beljakovine. Pomembna je pri vezavi na celične receptorje in ključna za določanje antigenih lastnosti virusa (Chakravarty in sod., 2005).

ORF3 leži na 3'koncu RNA in nosi zapis za manjšo (22,5 kDa) bazično strukturo beljakovino VP2 dolžine 212 aminokislin (Atmar in Estes, 2001; Belliot in sod., 2003), ki se nahaja na notranji površini virusne kapside in za katero predvidevajo, da naj bi sodelovala pri vezavi na RNA (Koopmans in sod., 2003; Hardy, 2005).



Slika 3: Kapsida, domeni S in P (Hutson in sod., 2004).

Znotraj iste genske skupine imajo človeški norovirusi najmanj 60 % aminokislinsko podobnost kapsidne beljakovine VP1. Podobnost med genskima skupinama GI in GII znaša manj kot 50 %. Noroviruse lahko dalje uvrščamo v genotipe. Da jih uvrstimo v isti genotip, mora biti zadoščen kriterij aminokislinske podobnosti kapsidne beljakovine VP1 v 80 % (Hutson in sod., 2004).

2.4 PATOGENEZA IN GOSTITELJEVA OBČUTLJIVOST NA OKUŽBO

S človeškimi kalicivirusi se ljudje okužijo po oralni poti. Ker so virusi odporni na kislino okolje, preživijo v želodcu in potujejo do tankega črevesa, kjer se razmnožujejo (Caul, 1996b).

Kljub številnim poskusom, narejenim v zadnjih 40 letih, znanstveniki še vedno ne poznajo načina za gojenje norovirusov v celičnih kulturah, zato je znanje o patogenezi teh virusov nezadostno. V zgodnjih študijah na prostovoljcih pred tridesetimi leti so ugotovili histopatološke spremembe v tankem črevesu obolelih ljudi (Troeger in sod., 2009). Notranja površina tankega črevesa ni ravna, temveč oblikuje številne gube, ki povečujejo površino, in izboljšajo mešanje prebavne vsebine. Mukozna membrana tvori številne izrastke, ki štrlijo v svetlino črevesa in so pokrite z epitelnimi celicami. Plazmatska membrana absorpcijskih epitelnih celic tankega črevesa je podaljšana s tesno nameščenimi mikrovili. Značilno za epitelije je, da celice ležijo na bazalni membrani, tesno druga ob drugi in da je med njimi zelo malo medceličnine. Epiteliji nimajo lastnih krvnih in limfnih žil, prehranjujejo se z difuzijo iz žil v spodaj ležečem vezivnem tkivu (Turner, 2003). Pri okuženih bolnikih so opazili, da pride do vnetja notranje plasti sluznice in do morfoloških sprememb epiteljskih celic. Vidno je skrajšanje mikrovilov in zmanjšana aktivnost encimov na površini mikrovilov. Driska, kot ena izmed posledic okužbe, nastane zaradi difuzije vode in ionov iz subepiteljskih kapilar v črevesno svetlino zaradi slabljenja tesnih stikov med epiteljskimi celicami. Dva tedna po okužbi se celice vrnejo v prvotno stanje in pridobijo normalen histološki videz (Troeger in sod., 2009).

Preučevali so tudi imunski odziv bolnikov na okužbo. V številnih raziskavah so ugotovili, da okužene osebe lahko razvijejo kratkotrajno imunsko zaščito, ki traja od 6 do 14 tednov, vendar le za ponovne okužbe z virusi sorodnega seva (Patel in sod., 2008).

Že pred 25 leti so izvedli študijo, s katero so pokazali, da je določena skupina posameznikov občutljiva na okužbo z norovirusi, medtem ko je druga skupina posameznikov na okužbo odporna. Predvidevali so, da na dovzetnost za okužbo pri človeku vpliva neki genski faktor. Nedavno so odkrili nov mehanizem, ki revolucionarno

podaja odgovore na ta vprašanja. Po tej raziskavi se norovirusi pritrdijo na gostiteljeve celice v črevesju le, če osebek izraža specifične, gensko določene ogljikove hidrate (Hutson in sod., 2004). To tudi razloži, zakaj nekatere osebe, ki imajo visoko raven protiteles prej zbolijo, kot pa osebe, ki nikoli niso imele protiteles. Oseba brez protiteles je verjetno neobčutljiva na okužbo z norovirusi. (Patel in sod., 2008)

2.5 BOLEZENSKI ZNAKI IN ZDRAVLJENJE

Najpogostejši bolezenski znaki, ki se pojavijo pri okužbi z norovirusi, so slabost, bruhanje, driska, povišana telesna temperatura, mrzlica, trebušni krči, glavobol, bolečine v grlu in mišicah (Kaplan in sod., 1982). Okužbo povzroči že 10-100 virusov (Caul , 1996a).

Inkubacijska doba je od 24 do 48 ur. Simptomi običajno trajajo 2 ali 3 dni. Zadnje študije pa so pokazale, da bolezen lahko traja tudi dlje časa (4-6 dni). Pri otrocih, mlajših od enega leta, se pogosteje pojavi driska, medtem ko je pri otrocih, starejših od enega leta, pogosteje bruhanje (Lopman in sod., 2004a; Rockx in sod., 2002). Norovirusi sicer niso glavni povzročitelji smrti, vendar pa za otroke, starostnike in ostale imunsko oslABLJENE osebe predstavljajo dodatno bolezensko breme in prispevajo k višji smrtnosti (Okada in sod., 2006). Povezali pa so jih tudi z nekrotizirajočim enterokolitisom (Turcios-Ruiz in sod., 2008).

Okužba je običajno blaga in bolezen sama zamre. Zdravimo z oralnim nadomeščanjem tekočine in elektrolitov (Dolin in sod., 1971).

2.6 EPIDEMIOLOGIJA

Norovirusi se najpogosteje širijo po fekalno–oralni poti (Widdowson in sod., 2005). Značilni so tako sporadični primeri kot izbruhi (Kroneman in sod., 2007). Virusi se prenašajo z aerosoli, ki se sproščajo pri bruhanju ali z mehanskim prenosom, preko kontaminiranih površin (Widdowson in sod., 2005). Virusi se širijo tudi neposredno z okuženega na zdravega človeka in s kontaminirano hrano ali vodo (Becker in sod., 2000).

Izbruhi se najpogosteje pojavijo v zaprtih skupnostih, kot so družine, šole, vrtci, vojaški oddelki, hoteli, bolnišnice, dijaški domovi, domovi za ostarele, velike turistične ladje, itd. (Poljšak-Prijatelj in sod., 2001).

Hiter prenos olajšujejo:

- nizka infekcijska doza (Teunis in sod., 2008),
- oseba lahko širi okužbo kljub temu, da sama nima značilnih bolezenskih znakov,
- virus je stabilen pri visokih koncentracijah klora (Duizer in sod., 2004) in pri temperaturah od zmrzišča pa do 60 °C,
- imunska zaščita ni trajna in zato lahko prihaja do ponavljajočih se okužb (Parrino in sod., 1977).

Okužbe se pojavljajo vse leto pri vseh starostnih skupinah, pogosteje v zimskih mesecih (Moreno-Espinosa in sod., 2004). Otroci, mlajši od pet let, imajo zelo pogosto visoko število protiteles proti norovirusom, kar nakazuje izpostavljenost okužbi že zgodaj v mladosti. Delež protiteles je najmanjši v prvem letu življenja in narašča s starostjo od drugega leta naprej (Dai in sod., 2004; Peasey in sod., 2004). Nekatere študije nakazujejo večjo pogostost okužb v manj razvitih državah (Greenberger in sod., 1979). Najpogostejše so okužbe z norovirusi genotipa GII.4 (Pelosi in sod., 1999).

Število izbruhov povzročenih z norovirusi se spreminja iz leta v leto. Tudi v Sloveniji beležijo v zadnjih petih letih 86 izbruhov z norovirusi. (Kroneman in sod., 2007; Poljšak-Prijatelj in sod., 2008).

2.7 DIAGNOSTIČNE METODE

2.7.1 Elektronska mikroskopija

Ker človeških kalicivirusov ni možno gojiti v celičnih kulturah, je predstavljala elektronska mikroskopija temeljno diagnostično metodo. Vzorce pripravijo s tehniko negativnega kontrastiranja. Metoda je nizko občutljiva, saj je za njeno uspešnost potrebnih vsaj 10^6

virusnih delcev na mililiter iztrebka. Detekcija virusov je še mogoča približno 48 ur po prenehanju bolezenskih znakov. Poleg nizke občutljivosti je dodatna slabost elektronske mikroskopije draga oprema in zahteva po dobro usposobljenem osebju.

Norovirusi imajo zabrisano čašasto kalicivirusno strukturo in jih zato pod mikroskopom težje določijo (Lopman in sod., 2002).

2.7.2 Dokazovanje virusnih antigenov

Znanstveniki so zasnovali ekspresijski sistem bakulovirusov, da bi pridobili večje količine kapsidnih beljakovin. Pridobljene beljakovine samo-sestavijo v virusom podobne delce (ang. VLP: virus like particles) (Jiang in sod., 1992b), ki so morfološko in antigensko podobni norovirusom, najdenim v iztrebkih. Iz celičnih kultur so te virusom podobne delce z lahkoto osamili. Ker ostanejo stabilni pri temperaturah 4 °C ali manj, jih uporabljajo pri razvoju diagnostičnih metod (Prasad in sod., 1999).

Pogosto je velika težava encimsko imunskih testov v njihovi nizki občutljivosti. Razlog za lažno negativne rezultate je lahko v porušenju antigenske strukture, kar prepreči vezavo antigena (Rabenau in sod., 2003).

Najpogosteje uporabljamo sistem dvojnih protiteles ("sendvič" metoda). Reakcijo izvedemo tako, da izbrana virusna protitelesa vežemo na trden nosilec, ki je ponavadi mikrotitracijska ploščica z vdolbinicami. Nato dodamo vzorec. Če so v vzorcu ustrezni virusni antigeni, nastane komplek protitelesa in antigena. Na nastale komplekse vežemo druga, z encimom označena protitelesa. Na koncu dodamo še primerni substrat, ki po delovanju encima spremeni barvo. Z opazovanjem spremembe barve ali z merjenjem absorbance pri predpisani valovni dolžini ugotovimo, ali so v testirane vzorcu antigeni (Marin, 2005).

2.7.3 Dokazovanje nukleinske kisline

Jiang in De Leon sta bila leta 1992 prva, ki sta uspela pomnožiti RNA virusa Norwalk. Od takrat dalje je to postala običajna diagnostična in raziskovalna metoda (Jiang in sod., 1992a).

Zaradi velike genetske raznolikosti znotraj družine *Caliciviridae* je bil izziv najti primerno občutljive in specifične začetne oligonukleotide, ki bi določevali vse norovirusne seve. Večina široko specifičnih začetnih oligonukleotidov nalega na dobro ohranjene dele virusne RNA, ki kodirajo polimerazo. Za razlikovanje med genskimi skupinami pa se uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki so specifični za kapsidni del RNA (Lopman in sod., 2002).

Pravo revolucijo je povzročil razvoj RT-PCR v realnem času (ang. Real time RT-PCR). Ta metoda omogoča pomnoževanje nukleinske kisline in hkratno zaznavanje pomnoženega PCR pridelka s fluorescentnim barvilom. Ker se obe reakciji izvajata sočasno, sta tako veliko hitrejši kot običajna metoda RT-PCR. Zmanjšane so tudi možnosti kontaminacij. Specifičnost in občutljivost pa v primerjavi z običajnim RT-PCR nista nič manjši. Zaradi vseh teh lastnosti je postal RT-PCR v realnem času nepogrešljiv pri diagnostiki mnogih infekcijskih bolezni (Espy in sod., 2006).

2.7.3.1 Princip delovanja RT-PCR v realnem času

Z RT-PCR v realnem času pomnožimo določen odsek genoma norovirusov. Reakcije lahko izvajamo enostopenjsko ali dvostopenjsko. Ker je izhodiščna molekula RNA, se mora ta najprej prepisati z encimom reverzna transkriptaza v komplementarno verigo cDNA (ang. complementary DNA), šele nato sledi pomnoževanje prepisane cDNA. V dvostopenjski reakciji oba postopka izvajamo ločeno, medtem ko pri enostopenjski oba potekata v eni epruveti (Wong in Medrano, 2005).

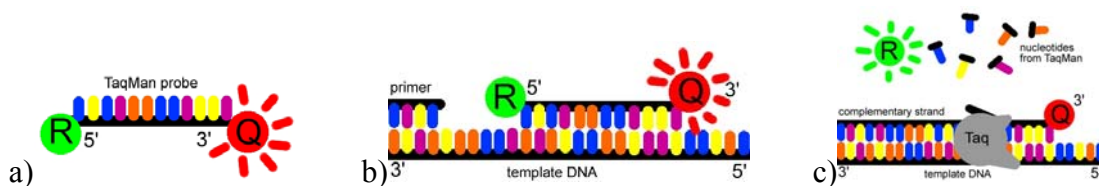
Po transkripciji sledi razgradnja nastalega hibrida RNA in cDNA, prav tako z reverzno transkriptazo. DNA polimeraza nato prepíše cDNA v dvovijačno DNA. Sledi denaturacija.

Verigi se običajno ločita pri temperaturi od 90 do 95°C. Nato sledi znižanje temperature na od 50 do 60°C in na komplementarne dele DNA se nalegajo specifični začetni oligonukleotidi. Kadar uporabljamo PCR v realnem času, so mesta vezave začetnih oligonukleotidov do 100 baznih parov narazen. Po končani vezavi se temperatura dvigne na 72°C in toplotno stabilna *Taq* polimeraza podaljšuje verigo DNA v smeri od 5' proti 3' koncu. Iz prvotne ene molekule cDNA dobimo dve novi, ki sta med sabo komplementarni in v naslednjem ciklu vezeta enake začetne oligonukleotide. Običajno steče od 30 do 40 takšnih pomnoževalnih ciklov. Značilni tarčni deli DNA se tako eksponentno kopičijo (Class in sod., 2007).

Dodatek ustrezne sonde v začetno reakcijsko mešanico omogoča sprotno spremljanje nastalih pridelkov. Obstajajo različne sonde, kot so: *TaqMan* sonde, molekularni oddajniki (ang. molecular beacons), FRET hibridizacijske sonde idr. Najbolj pogosto uporabljene so *TaqMan* sonde.

a) *TaqMan* sonde

Gre za kratko zaporedje DNK, ki ima na 5' koncu vezan fluorofor in na 3' koncu dušilec (ang. quencher). Ko sta vezana skupaj, fluorofor prejeto svetlobno energijo odda v obliki fluorescence, to pa sprejme dušilec in odda v obliki toplote. Fluorescence ne zaznamo. Nukleotidno zaporedje sonde je komplementarno izbranemu tarčnemu zaporedju in če je to prisotno, se bo nanj vezalo, v nasprotnem primeru pa ne. Če torej do povezave pride, ga med reakcijo podaljševanja verige doseže *Taq* polimeraza in ga s svojo 5' proti 3' eksonukleazno aktivnostjo razcepi. Dušilec in fluorofor nista več povezana. Pride do oddajanja fluorescence, ki se kopiči med cikličnim pomnoževanjem DNA. Več kot je PCR pridelka, močnejša je fluorescenca.



Slika 4: Prikaz delovanja RT-PCR v realnem času z uporabo Taqman sonde (Real time PCR, 2003). a) Taqman sonda z vezanim fluoroforom na 5' koncu in dušilec na 3' koncu, b) sonda prepozna specifično zaporedje in se nanj veže, c) Taq polimeraza med reakcijo podaljševanja verige doseže in razgradi sondo, tako da dušilec in fluorofor nista več povezana.

b) Molekularni oddajniki

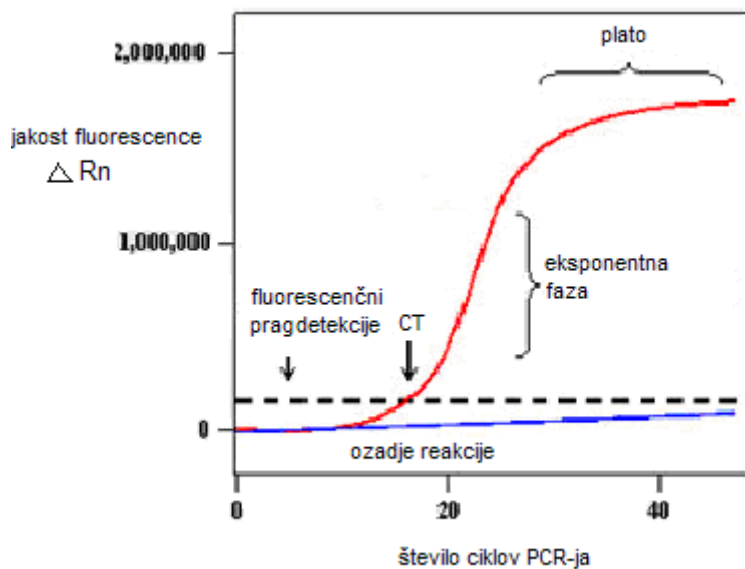
Tudi tukaj so krajša zaporedja DNA, ki je na odseku blizu 5' in 3' konca samo sebi komplementarno in tako tvori zanko. Ravno tako ima na 5' koncu vezan fluorofor in na 3' koncu dušilec. Ob hibridizaciji na komplementarno verigo pride do razmaknitve fluorofora in dušilca, kar omogoči, da fluorofor odda fluorescenco.

c) Hibridizacijski označevalci

V tem primeru gre za dva kratka oligonukleotida z vezano vsak po eno sondo, ki sta ob vezavi na komplementarno DNA v bližini. Tista, ki je bližje 5' koncu matrice, ima na 3' koncu fluorofor, ki deluje kot donor fotonov in drug oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezan fluorofor, ki deluje kot sprejemnik. S svetlobo ustrezne valovne dolžine vzbudimo donorski fluorofor in, če se obe sondi vežeta na tarčni PCR pridelek, bo svetlobno energijo iz fluorofora na 3' koncu absorbiral sprejemniški fluorofor na 5' koncu. Govorimo o FRET efektu (ang. fluorescence resonance energy transfer). Na koncu končni fluorofor emitira svetlobo daljše valovne dolžine, kot je bila na začetku uporabljena za vzbujenje prvega fluorofora. Tako se fluorescenca povečuje z vsakim ciklom pomnoževanja nukleinske kisline (Espy in sod., 2006).

Rezultate lahko spremljamo sproti na zaslonu v realnem času. Izpisuje jih program v obliki krivulje in z vrednostjo Ct, to je cikel praga detekcije (ang. Cycle threshold), ki nam pove, v katerem ciklu se prvič pojavi signal sonde in fluorescenčni signal preseže ozadje reakcije. Ko je ozadje reakcije preseženo, se začne izrisovati eksponentna krivulja. Med

reakcijo se z vsakim ciklom porabljajo dodani reagenti. Ekspozitivni fazi tako sledi plato. Nižja kot je vrednost Ct, več kopij izhodiščne DNA je v vzorcu (Class, 2007; What is Real time PCR, 2009).



Slika 5: Prikaz krivulje pomnoževanja nukleinske kisline (ICMG, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Klinični material

Testirali smo iztrebke, ki so jih na preiskave za gastroenteritične viruse prejeli v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

382 izbranih vzorcev iztrebkov od novembra 2008 do januarja 2009, pri katerih s testom ELISA IDEIATM nismo določili norovirusnih antigenov, smo preverili še z RT-PCR v realnem času.

Dodatno smo iz vzorcev iztrebkov, ki smo jih dalje prejeli v laboratorij, naključno izbrali 266 vzorcev in jih testirali na prisotnost norovirusnih antigenov s testom ELISA IDEIATM z namenom določiti specifičnost in občutljivost tega testa glede na RT-PCR v realnem času.

Kasneje smo iz vzorcev, ki so prihajali v laboratorij, izbrali še 53 vzorcev iztrebkov in jih testirali na prisotnost norovirusnih antigenov z novim testom ELISA RIDASCREEN[®] ter določili specifičnost in občutljivost glede na RT-PCR v realnem času.

Nabor vzorcev je vključeval tudi take, pri katerih smo določili druge gastroenteritične viruse: rotaviruse, astroviruse ali adenoviruse.

3.1.2 Reagenti za osamitev RNA s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)

- AVL pufer
- Etanol (96%-100%)
- AW1 pufer
- AW2 pufer
- AVE pufer
- QIAamp Mini Spin kolone
- Zbiralne epruvetke

3.1.3 Reagenti za reakcijo RT-PCR v realnem času z encimskim kompletom AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit (Ambion)

- ddH₂O – voda brez ribonukleazne aktivnosti
- reakcijski pufer One Step RT-PCR
- encimska mešanica
- **oligonukleotidi za gensko skupino GII**
 - COG2-F (proti 3` koncu usmerjen začetni oligonukleotid) (Preglednica 1)
 - COG2-R (proti 5` koncu usmerjen začetni oligonukleotid) (Preglednica 1)
 - RING2-TP
- **oligonukleotidi za interno kontrolo LUC RNA**
 - LUC-F (proti 3` koncu usmerjen začetni oligonukleotid)
 - LUC-R (proti 5` koncu usmerjen začetni oligonukleotid)
 - LUC-S
- **oligonukleotidi za gensko skupino GI**
 - COG1-F (proti 3` koncu usmerjen začetni oligonukleotid) (Preglednica 1)
 - COG1-R (proti 5` koncu usmerjen začetni oligonukleotid) (Preglednica 1)
 - RING1AB-TP
- Pozitivna kontrola (predhodno potrjena RNA norovirusov genske skupine I ali II)

Preglednica 1: Nukleotidna zaporedja in mesta prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov (Masaka in sod., 2005; Trottier in sod., 2006).

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5`-3`	Mesto naleganja
COG2-F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG ATG AG	5003-5028
COG2-R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5100-5080
COG1-F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	5291-5310
COG1-R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	5354-5375

3.1.4 Reagenti za encimsko imunski test IDEIATM Norovirus (Oxoid)

- Mikrotiterska ploščica z vezanimi specifičnimi antigeni za gensko skupino I in gensko skupino II norovirusov
- Negativna kontrola (razredčitveni pufer)
- Pozitivna kontrola (rekombinatni norovirusni antigeni, ki jih je priložil že sam proizvajalec)
- Konjugat za gensko skupino I in gensko skupino II
- Spiralni pufer
- Substrat TMB
- Raztopina za ustavitev reakcije

3.1.5 Reagenti za encimsko imunski test RIDASCREEN[®] Norovirus (Biopharm)

- Mikrotiterska ploščica z vezanimi specifičnimi antigeni za gensko skupino I in gensko skupino II norovirusov
- Negativna kontrola (razredčitveni pufer)
- Pozitivna kontrola (rekombinantni norovirusni antigeni, ki jih je priložil že sam proizvajalec)
- Konjugat 1 za gensko skupino I in konjugat 2 za gensko skupino II norovirusov
- Spiralni pufer
- Substrat TMB
- Raztopina za ustavitev reakcije

3.1.6 Potrošni material

- Plastične epruvete (10ml)
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- Nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- Staničevina
- Zaščitne rokavice
- Plastične pipete

3.1.7 Laboratorijska oprema

- Protiprašna komora za varno delo (ISKRA PIO)
- Mikrobiološka komora za varno delo (ISKRA LVF9)
- Namizna hlajena centrifuga (Eppendorf 5415R)
- Vibracijsko mešalo (BIOSAN, Bio Vortex V1)
- Stojalo za epruvete (Eppendorf)
- Avtomatske pipete (0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 50-200 μ l, 10-1000 μ l, 100-1000 μ l) (Eppendorf)
- Aparat za izvedbo RT-PCR v realnem času StepOneTM (Applied Biosystems)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava in shranjevanje vzorcev iztrebkov

V puferski raztopini smo suspendirali približno 1g iztrebkov, tako da smo dobili približno 10 % suspenzijo in centrifugirali 5 min pri 1600 g. Usedlino smo zavrgli, supernatante pa po potrebi hranili v hladilniku, ali jih zamrznili in nato nadaljne uporabili.

3.2.2 Osamitev RNA s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)

Postopek poteka pri sobni temperaturi. Najprej smo v 1,5 ml avtoklavirane epruvetke odpipetirali 170 µl vzorca in centrifugirali 5 min pri polni hitrosti (13200 obratov/min). Medtem smo zopet v 1,5 ml avtoklavirane epruvetke odpipetirali 560 µl pufra AVL in dodali 5,6 µl nosilca RNA in 1 µl interne kontrole. V vsako epruvetko smo dodali 140 µl centrifugiranega vzorca in mešali 15 sekund. Nato smo kratko centrifugirali, da smo odstranili kapljice z notranje strani pokrovčka epruvetk. Sledila je 10-minutna inkubacija na sobni temperaturi. Pripravili smo za vsak vzorec eno kolono (QIAamp Mini spin column) in 2 ml zbiralne epruvetke. Dodali smo 560 µl etanola (96-100%) in mešali 15 s. Vse smo na kratko centrifugirali. 630 µl raztopine smo prenesli na kolono za centrifugiranje (QIAamp Mini spin column), pokrili s pokrovčkom in centrifugirali 1 minuto pri 8000 obratih/min. Kolono smo nato prenesli v čisto 2 ml zbiralno epruvetko in zavrgli epruvetko s filtratom. Še enkrat smo prenesli v zbiralno epruvetko preostali volumen raztopine in centrifugirali pri istih obratih. Kolono smo nato prenesli v čisto 2 ml zbiralno epruvetko in zavrgli epruvetko s filtratom. Dodali smo 500 µl pufra AW1 (Buffer AW1). Sledilo je enominutno centrifugiranje pri 8000 obr/min. Kolono smo prenesli v čisto 2 ml zbiralno epruvetko in zavrgli epruvetko s filtratom. Dodali smo 500 µl pufra AW2 in centrifugirali 5 min pri polni hitrosti. Kolono smo prenesli v 1,5 ml epruvetko in dodali 60 µl pufra AVE (Buffer AVE). Epruvetko smo pokrili in inkubirali 1 minuto na sobni temperaturi, nato pa centrifugirali 1 min pri 8000 obr/min. RNA smo shranili -70 °C.

3.2.3 RT-PCR v realnem času

Pomnoževanje RNA smo izvedli v aparatu StepOne™. Uporabili smo reagente encimskega kompleta AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Ambion) in ustrezne oligonukleotide. V 1,5 ml epruvetki smo pripravili mešanico. Za eno reakcijo (25 µl) smo potrebovali 22 µl :

-1,5 µl vode brez nukleazne aktivnosti

-12,5 µl reakcijskega pufra

-1 µl začetnega oligonukleotida LUC F (10µM) za interno kontrolo LUC

- 1 μ l začetnega oligonukleotida **LUC R** (10 μ M) za interno kontrolo LUC
- 2 μ l začetnega oligonukleotida **COG2-F** (10 μ M) za noroviruse GII, ali **COG1-F** (10 μ M) za noroviruse GI
- 2 μ l začetnega oligonukleotida **COG2-R** (10 μ M) za noroviruse GII, ali **COG1-R** (10 μ M) za noroviruse GI
- 0,5 μ l sonde **FAM-RING2-TP-BBQ** za noroviruse GII, ali **FAM-RING1AB-TP-BBQ** za noroviruse GI. Sondi sta označeni s fluoroforom FAM in dušilcem BBQ.
- 0,5 μ l sonde **YY-LUC-S-BHQ** z vezanim dušilcem BHQ in fluoroforom YY (Yakima Yellow)
- 1 μ l encimske mešanice

V posamezno epruvetko (posamično, v stripu ali v luknjico na ploščici) smo odpipetirali **22 μ l** reakcijske mešanice. To smo prenesli v protiprašno komoro in dodali še **3 μ l** negativne kontrole (vodo, prosto nukleaz), RNA vzorcev in pozitivno kontrolo (predhodno potrjena RNA norovirusov genske skupine I ali II). Pokrili smo luknjice s pokrovčki in vstavili v aparat StepOne.

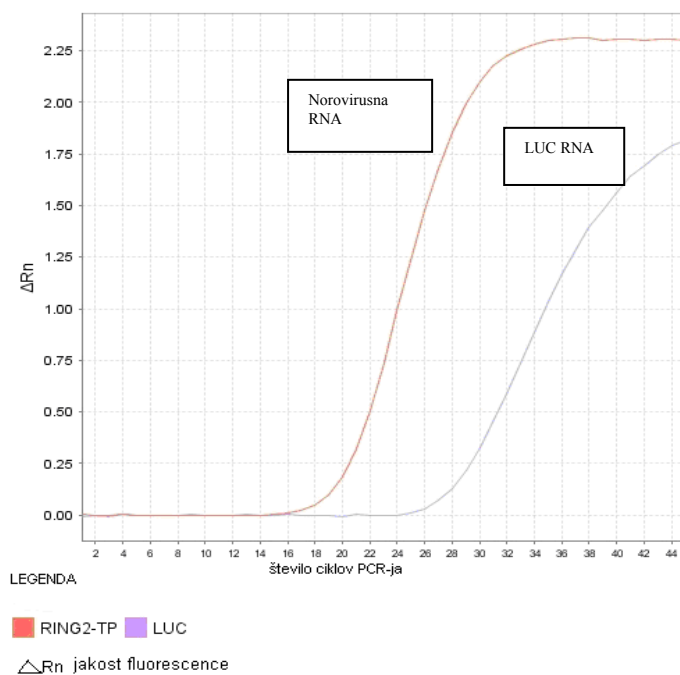
Časovni potek RT-PCR v realnem času je podan v Preglednici 2.

Preglednica 2: Časovni in temperaturni potek RT-PCR v realnem času.

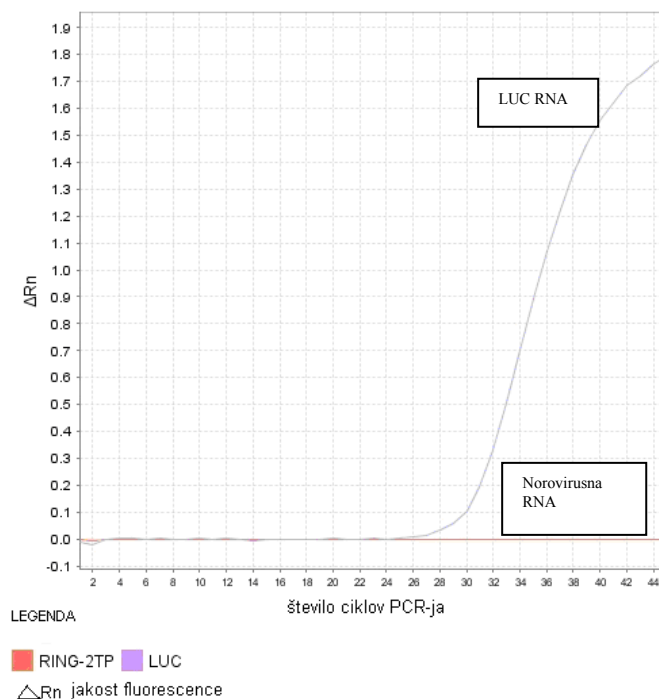
		Čas
	Reverzna transkripcija	45°C, 10 min
	Prekinitev delovanja reverzne transkriptaze in aktivacija polimeraze	95°C, 10 min
45 ciklov	Denaturacija	95°C, 15 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige	56°C, 45 s

Interno kontrolo LUC RNA smo uporabili za preverjanje uspešnosti osamitve RNA in za preverjanje uspešnosti pomnoževanja. V primeru, da se LUC ni pomnožil, smo vzorec RNA 10x redčili, in ponovili RT-PCR.

Po koncu postopka smo odčitali rezultate (Slika 6 in 7).



Slika 6: Prikaz pozitivnega rezultata na prisotnost norovirusne RNA z aparatom StepOne™ (Applied Biosystems)



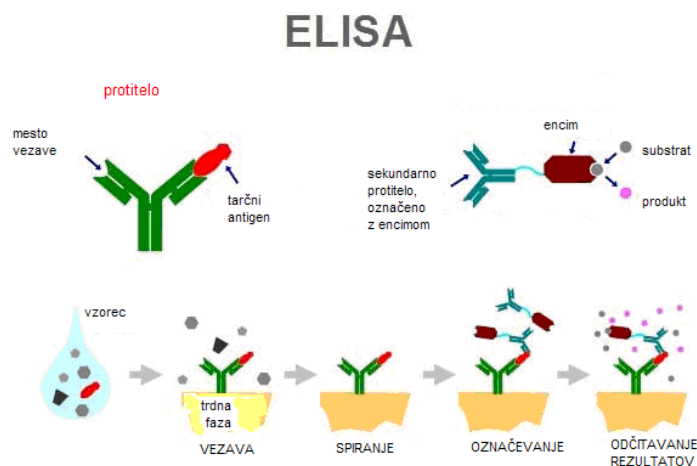
Slika 7: Prikaz negativnega rezultata na prisotnost norovirusne RNA z aparatom StepOne™ (Applied Biosystems)

3.2.4 Izvedba encimsko imunskega testa IDEIA™ Norovirus (Oxoid)

IDEIA™ Norovirus je kvalitativni test za dokazovanje norovirusov genskih skupin GI in GII. Test deluje na principu sendvič metode. Vsebuje kombinacijo monoklonskih in poliklonskih protiteles specifičnih za gensko skupino GI in GII.

Uporabili smo mikrotitersko ploščico, ki ima v vdolbinicah vezana specifična monoklonska protitelesa, usmerjena proti antigenom GI in GII. V vdolbinice smo nanegli po 100 μ l vzorca in v dve vdolbinici še pozitivno in negativno kontrolo iz kompleta. Vzorcem in kontrolam smo dodali 100 μ l encimskega konjugata, rahlo pretresli, pokrili s folijo in inkubirali 1 uro. Konjugat vsebuje za GI in GII specifična kunčja poliklonska protitelesa, označena z encimom hrenova peroksidaza. Antigen norovirusov v vzorcu se ujame med protitelo, vezano na trden nosilec in protitelo, označeno z encimom. Po pretečenem času smo 3x spirali s 350 μ l spiralnega pufru. Tako se odstranijo presežek vzorca in nevezana protitelesa. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 100 μ l substrata, pokrili ploščico s folijo in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Specifična protitelesa vezana z encimom smo zaznali po spremembi barve substrata v modro (Slika 8). Kjer specifičnih protiteles ni, se barva ne spremeni. Po pretečenem inkubacijskem času smo

dodali še raztopino za ustavitev reakcije, ki vsebuje žveplovo kislino in barva se je iz modre spremenila v rumeno. Izmerili smo absorbanco s spektrofotometrom pri valovni dolžini 450 nm. Intenziteta barve kaže, da so prisotni norovirusni antigeni GI ali GII.

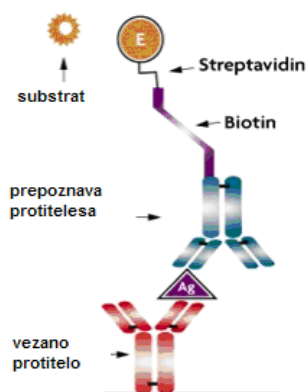


Slika 8: Encimsko imunski test – »sendvič metoda« (Biosystem Development, 2007).

3.2.5 Izvedba encimsko imunskega testa RIDASCREEN[®] Norovirus (Biopharm)

Uporabili smo mikrotitersko ploščico, katera ima v vdolbincah vezana specifična protitelesa, usmerjena proti antigenom GI in GII. V vdolbinice smo nanegli po 100 µl razredčenega vzorca in v dve vdolbinici še pozitivno in negativno kontrolo iz kompleta. Če so ustrezni antigeni prisotni, se bodo vezali na protitelesa. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 100µl encimskega konjugata 1, rahlo pretresili na delovni površini, pokrili s folijo in inkubirali 60 min. Konjugat 1 vsebuje specifična monoklonska protitelesa, na katera je vezan biotin. Ta protitelesa se vežejo na poprej nastali kompleks imobiliziranega protitelesa in antigena. Po pretečenem času smo odlili tekočino v odpadno posodo. Sledilo je spiranje s 300 µl spiralnega pufra. Tako se odstrani presežek vzorca in nevezanih protiteles. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 100 µl konjugata 2 in inkubirali na sobni temperaturi 30 minut. Konjugat 2 vsebuje streptavidin in encim peroksidazo. Streptavidin se veže na biotin. Po pretečeni inkubaciji smo vdolbinice sprali s petkratnim spiranjem s 300 µl spiralnega pufra. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 100µl substrata, pokrili ploščico s folijo in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Encim peroksidaza, vezana na streptavidin, ob dodatku substrata le-tega pretvori v moder produkt (Slika 9). Če do

kompleksa med imobiliziranimi protitelesi, norovirusnimi antigeni in biotin-streptavidin-peroksidaznim kompleksom ne pride, se barva ne spremeni. Po pretečenem inkubacijskem času smo dodali še 1 kapljico raztopine za ustavitev reakcije, ki vsebuje žveplovo kislino in barva se je iz modre spremenila v rumeno. S spektrofotometrom smo pri valovni dolžini 450 nm izmerili optično gostoto.



Slika 9: Encimsko imunski test s kompleksom biotin-streptavidin-peroksidaza (Bender MedSystems, 2007)

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI VZORCEV TESTIRANIH Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU

Z metodo RT-PCR v realnem času smo pregledali 382 vzorcev iztrebkov, ki so bili z običajnim testom ELISA IDEIATM negativni na prisotnost norovirusnih antigenov. Izkazalo se je, da je bilo kar 70/382 (18,32 %) vzorcev dejansko pozitivnih (Preglednica 3).

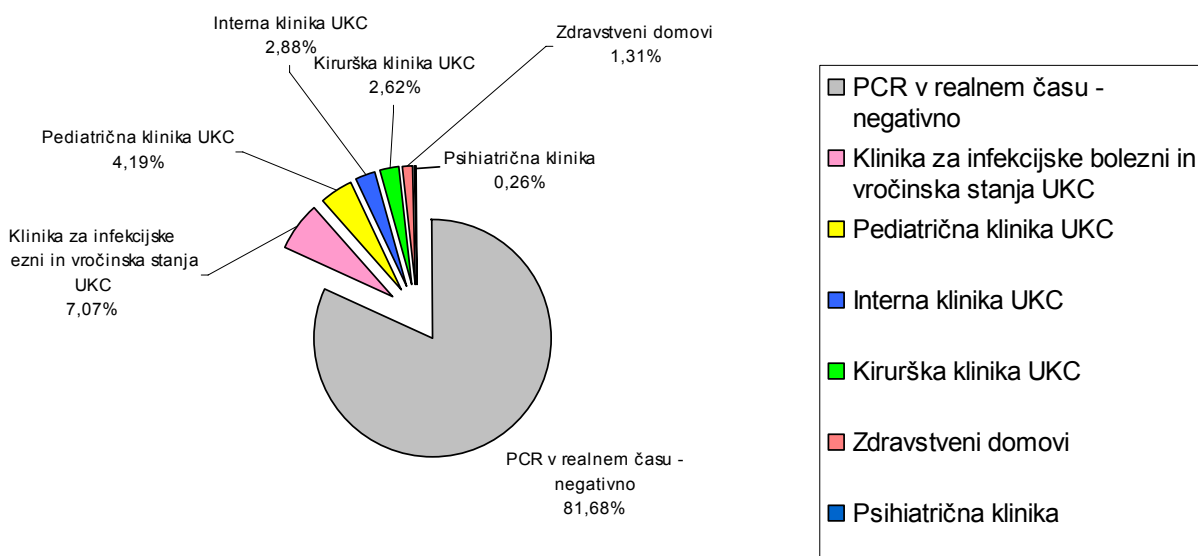
Preglednica 3: Rezultati RT-PCR v realnem času vzorcev iztrebkov, pri katerih smo predhodno izvedli test ELISA IDEIATM, vendar nismo določili norovirusnih antigenov.

TEST	ŠTEVILO	ODSTOTEK
ELISA NEGATIVNI-Skupaj	382	100%
<u>RT-PCR NEGATIVNI</u>	312	81,68%
<u>RT-PCR POZITIVNI</u>	70	18,32%

4.1.1 Značilnosti vzorcev, pozitivnih z metodo RT-PCR v realnem času

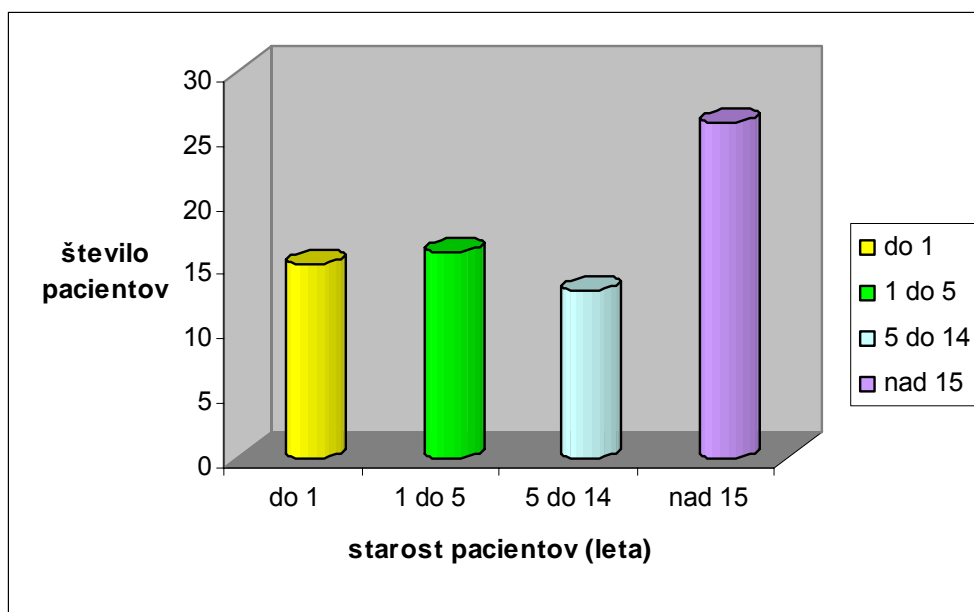
70 pozitivnih vzorcev z RT-PCR v realnem času, smo dodatno analizirali. Preverili smo, iz katerih klinik so bili poslani, kolikšna je bila starost bolnikov okuženih z norovirusi in v katerih mesecih so bile okužbe bolj pogoste.

Razvidno je, da je bilo največ vzorcev poslanih iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC, sledijo ji Pediatrična klinika UKC, Kirurška klinika UKC, Interna klinika UKC, različni zdravstveni domovi ter Psihiatrična klinika (Slika 10).



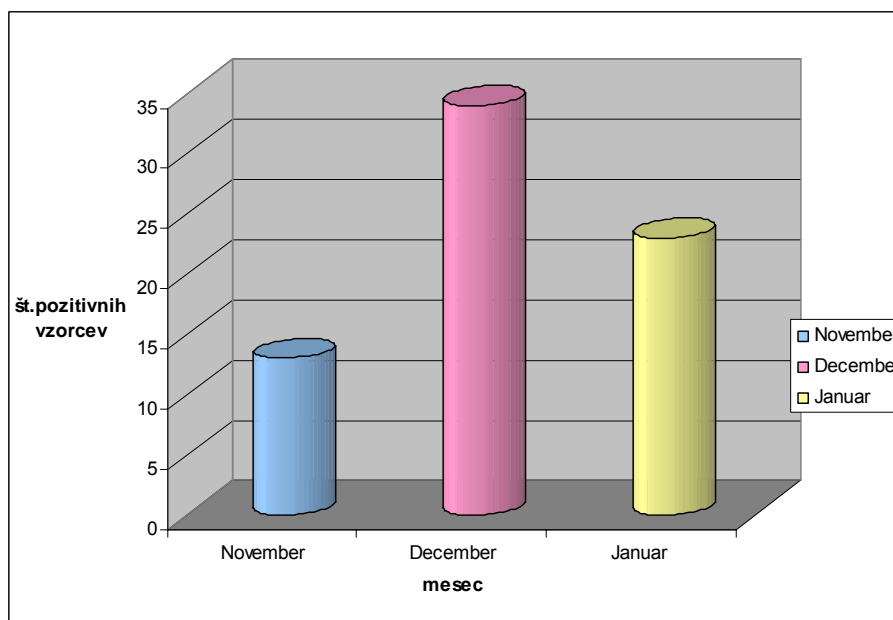
Slika 10: Razporeditev pozitivnih vzorcev bolnikov obolenih za okužbo z norovirusi po pošiljateljnih v obdobju od novembra 2008 do februarja 2009.

Največ bolnikov je bilo starejših od 15 let. Sledila je skupina otrok starih od enega do štirih let, nato dojenčki do enega leta starosti. Manj zastopana je bila skupina otrok starih od petega do štirinajstega leta (Slika 11).



Slika 11: Število obolelih za okužbo z norovirusi glede na starost obdobju od novembra 2008 do februarja 2009.

Vzorci iztrebkov smo spremljali le tri mesece. Po analizi podatkov se je izkazalo, da je bil največji delež okužb v decembru, sledi januar in nato november (slika 12).



Slika 12: Razporeditev pozitivnih vzorcev bolnikov obolenih za okužbo z norovirusi v obdobju od novembra 2008 do februarja 2009.

4.2 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA ELISA IDEIATMNorovirus

Preverjali smo občutljivost in specifičnost testa IDEIATM pri 266 vzorcih iztrebkov glede na rezultate RT-PCR v realnem času. Rezultati so podani v Preglednici 4. Specifičnost je bila visoka -94,24 %, medtem ko je bila občutljivost nizka - 30,67 %.

Preglednica 4: Rezultati vzorcev iztrebkov pregledanih s testom ELISA IDEIATMNorovirus in RT-PCR v realnem času.

TEST	RT-PCR poz	RT-PCR neg	Skupaj
ELISA poz	23	11	34
ELISA neg	52	180	232
Skupaj	75	191	266

11 vzorcev iztrebkov, ki so bili s testom ELISA pozitivni, z metodo RT-PCR v realnem času pa negativni smo dodatno preverili. Ker test ELISA zaznava antigene norovirusov genske skupine GI in GII norovirusov, z RT-PCR v realnem času pa smo preverjali le prisotnost najbolj pogoste genske skupine GII norovirusov, smo naredili še RT-PCR v realnem času za noroviruse genske skupine GI. Izkazalo se je, da so bili negativni tudi na noroviruse genske skupine GI

4.3 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST TESTA ELISA RIDASCREEN[®]

Preverjali smo občutljivost in specifičnost testa ELISA RIDASCREEN[®] pri 53 vzorcih iztrebkov glede na rezultate RT-PCR v realnem času. Rezultati so prikazani v Preglednici 5. Na podlagi rezultatov smo izračunali specifičnost- 95,6 % in občutljivost -50 %.

Preglednica 5: Rezultati vzorcev iztrebkov pregledanih s testom ELISA in RT-PCR v realnem času.

TEST	RT-PCR poz	RT-PCR neg	Skupaj
ELISA poz	4	2	6
ELISA neg	4	43	47
Skupaj	8	45	53

5 RAZPRAVA

Gastroenteritis je ena izmed najbolj pogostih obolenj pri ljudeh (Atmar in Estes, 2001). V Veliki Britaniji ima vsaka peta oseba letno okužbo črevesja in letno hospitalizirajo preko 35 tisoč oseb, smrtnih primerov pa je približno 300 (Lopman in sod., 2002). Povzročitelji so lahko zelo različni, kot so bakterije, paraziti, virusi. V samem vrhu virusnih povzročiteljev se pojavljajo tudi norovirusi (Atmar in Estes, 2001). Študije, ki so jih naredili v Veliki Britaniji, ZDA, Finski, Švedski, Norveški, Nemčiji in na Japonskem, so pokazale, da so norovirusi odgovorni za 50% vseh gastroenteričnih izbruhov. Okužbe z njimi so pogostejše v zimskih mesecih. Običajno se število okužb začne povečevati v oktobru in novembru, višek doseže nekje v januarju, nato pa se začne postopno zmanjševanje z zaključkom v maju ali juniju. Okužba z norovirusi se lahko pojavi pri ljudeh vseh starostnih skupin, čeprav so bolj pogoste okužbe otrok mlajših od pet let in odraslih oseb (Lopman in sod., 2002). Razlogi za njihovo hitro širjenje so nizka infektivna doza, dobra stabilnost v okoljih z visoko koncentracijo klora in nizkih temperaturah, kratkotrajna imunska zaščita ter široka genetska raznolikost znotraj rodov (Teunis in sod., 2008; Duizer in sod., 2004; Parrino in sod., 1977). Ugotovili so, da število okužb iz leta v leto narašča in v štirih državah so celo zaznali povečano število izbruhov v pomladnih in poletnih mesecih. Do povečanega števila izbruhov in spremenjenega vzorca sezonskega pojavljanja gastroenteritisa je prišlo hkrati s pojavom novega seva znotraj genotipa 4. genske skupine II–GII.4 (Lopman in sod., 2004b). Novi sevi GII.4 se pojavljajo vsako drugo leto in nekaj let kasneje že izginejo, kar nakazuje na zelo hitro evolucijo teh virusov. Vzrok za to bi lahko bil v mutacijah aminokislinskih regij na površini virusnih delcev (Kroneman in sod., 2008). V bolnišnicah, domovih za ostarele in ostalih zaprtih ustanovah se okužbe širijo najhitreje (Poljšak-Prijatelj in sod., 2001). Ko so raziskovali delež izbruhov v posameznih okoljih v Sloveniji med leti 2001 in 2008, so ugotovili da je bilo 25% izbruhov v domovih za ostarele, 24 % v restavracijah in hotelih, 16 % v vrtcih, 14 % v bolnišnicah, 11 % v počitniških hišicah ter 5 % v šolah (Poljšak-Prijatelj in sod., 2008).

5.1 RT-PCR V REALNEM ČASU ZA PREVERJANJE NOROVIRUSNE RNA V VZORCIH, KI SO BILI PREDHODNO NEGATIVNI Z OBIČAJNIM TESTOM ELISA IDEIATM

Glavni namen raziskovalcev v diagnostičnih laboratorijih je preprečiti nadaljnje širjenje okužb in zagotoviti, da bolnik v primeru okužbe dobi primerno zdravljenje. Poleg tega se želimo izogniti nepotrebemu zdravljenju z antibiotiki v primeru, ko gre za virusno okužbo. Pomembno je, da klinični material pregledamo čim hitreje in s čim bolj zanesljivimi metodami. Vse diagnostične metode imajo svoje slabosti in prednosti. Test ELISA je hiter in preprost za uporabo, toda velik problem predstavlja nezadovoljiva občutljivost in/ali specifičnost metode. RT-PCR v realnem času je hitra metoda, visoko specifična in občutljiva, omogoča tudi hkratno zaznavo različnih genotipov norovirusov. Toda zahteva izkušeno osebje in drago opremo. Vendar pa je pri imunsko oslabljenih osebah zelo pomembna natančna in hitra diagnostika. (Rabenau in sod., 2003; De Bruin in sod., 2006).

Analizirali smo 382 vzorcev, ki so bili predhodno negativni s testom ELISA IDEIATM. V raziskavo smo vključili tudi nekaj vzorcev, pri katerih smo dokazali druge virusne povzročitelje gastroenteritisa, kot so rotaviruse, adenoviruse, ali astroviruse. 18,32 % od skupno 382 vzorcev, je bilo po testiranju z metodo RT-PCR v realnem času pozitivnih. Rezultati so bili pričakovani, saj velja RT-PCR v realnem času za bolj občutljivo in specifično metodo kot je ELISA. Pri testu ELISA potrebujemo večjo koncentracijo virusov v vzorcu kot pri RT-PCR, kjer je dovolj že prisotnost same RNA neaktivnega, razgrajenega virusa. RT-PCR nam tako omogoča določanje virusov še dva tedna in več po začetku okužbe. Problem lahko predstavlja tudi velika genska raznolikost norovirusov. Test ELISA zazna antigene različnih genskih skupin in tipov norovirusov. Proizvajalec teh testov je zajel najpogostejše genske skupine in tipe norovirusov. Toda ti virusi so gensko zelo raznoliki in obstaja možnost, da test ELISA določenih genskih tipov ni zaznaval, medtem ko smo z metodo RT-PCR v realnem času pomnoževali ohranjen odsek norovirusne RNA vseh znanih genotipov (Gray in sod., 2007). Možnost lažno pozitivnih rezultatov kot posledico kontaminacij lahko izključimo, saj se v nobenem primeru ni zgodilo, da bi se pomnoževala negativna kontrola.

Ugotovili smo, da je bilo največ pozitivnih vzorcev poslanih iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC. To smo tudi pričakovali, saj so tja sprejeti bolniki s sumom na okužbo z različnimi virusnimi in tudi drugimi povzročitelji bolezni. Veliko število bolnikov je tudi prihajalo iz Pediatrične klinike, Kirurške klinike in Interne klinike. V te klinike namreč prihajajo bolniki z drugimi primarnimi boleznimi oz. stanji in se z norovirusi pogosto okužijo v bolnišnici ali pa se bolezenski znaki norovirusne okužbe pojavijo kmalu po ali tik pred sprejemom v bolnišnico. Bolniki so pogosto tudi imunsko oslabljeni, ter tako bolj dovzetni za okužbe, ki so nemalokrat dolgotrajne.

Pri nadaljnji analizi pozitivnih vzorcev smo ugotovili, da je bilo največ bolnikov starih nad 15 let. Rezultati niso povsem v skladu s pričakovanji. Kljub temu, da je znano, da norovirusi lahko prizadenejo vse starostne skupine, so že v prejšnjih študijah ugotovili, da so bolj izpostavljeni otroci do petega leta in starostniki. Le-ti so bili v našem diplomskem delu vključeni v skupino bolnikov starih nad petnajst let in pričakovano je bilo pri njih največ pozitivnih primerov. Smo pa pričakovali večji delež tudi pri otrocih mlajših od petega leta. Na Švedskem raziskava iz leta 2004 to potrjuje, saj je bila večina okuženih bolnikov stara nad 70 let in mlajša od 5 let. So pa v raziskavi vzorce pregledovali ali z elektronsko mikroskopijo, metodo RT-PCR v realnem času ali s testom ELISA oz. s kombinacijo dveh ali vseh treh naštetih diagnostičnih metod (Martin in sod., 2004), medtem ko smo mi uporabili le dve diagnostični metodi, test ELISA in metodo RT-PCR.

Pričakovano je tudi bilo najvišje število pozitivnih vzorcev v mesecu decembru. V Italiji je skupina znanstvenikov vseh 12 mesecev leta 2002 spremljala okužbe z norovirusi. Ugotovili so, da so bile okužbe prisotne v skoraj vseh mesecih, z izjemo aprila in junija. Povečano število okužb se je pojavilo že v avgustu in septembru, največji delež okužb pa je bil od novembra do februarja, z vrhom v januarju, nato pa je sledilo postopno zmanjševanje obolelih oseb in se zaključilo v mesecu maju (Medici in sod., 2006). Podobno raziskavo so naredili tudi v Tajvanu med januarjem leta 2004 in marcem leta 2005. Največ okužb je bilo od novembra do februarja (Wu in sod., 2008).

Podobno raziskavo so izvedli tudi v Sloveniji, kjer so spremljali kalicivirusne izbruhe med leti 2001 in 2008. Ugotovili so, da je največji delež izbruhov od oktobra do marca. Izbruhi

se pojavljajo tudi v ostalih mesecih vendar v nižjem številu (Poljšak-Prijatelj in sod., 2008).

5.2 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA ELISA IDEIA™

Skupno smo pregledali 266 vzorcev s testom ELISA in RT-PCR v realnem času, ki smo ga uporabili kot »zlati standard«.

Proizvajalec testa ELISA IDEIA™ Norovirus navaja podatke o relativni občutljivosti in specifičnosti. Občutljivost znaša 72,8 %, specifičnost pa 100 % glede na predhodna testiranja z metodo RT-PCR. Vendar pa opozarjajo, da negativni rezultat testa ne izključuje možnosti okužbe z norovirusi pri bolnikih, saj je možnih več vzrokov zakaj do detekcije ni prišlo. Ti vzroki so: pridobitev vzorca ob neprimernem času poteka bolezni, ko je prisotnih premalo virusov, neprimerno vzorčenje in/ali neprimerna obdelava vzorcev. Izračunana občutljivost v našem primeru je bila zelo nizka, le 30,67 %, medtem ko je bila specifičnost 94,24%, kar zelo odstopa od navedb proizvajalca.

Podobno raziskavo so izvedli tudi na Nizozemskem. S testom ELISA istega proizvajalca so pregledali 158 vzorcev, in poročali o občutljivosti 38% in specifičnosti 96%. Kot razlog za takšne rezultate navajajo veliko genetsko raznolikost norovirusov in posledično manjšo možnost, da s testom ELISA zajamemo vse genske skupine in genotipe. V svojo raziskavo so prav tako vključevali vzorce, kjer so dokazali rotaviruse in astroviruse, vendar nobeden od teh vzorcev ni lažno navzkrižno reagiral (De Bruin in sod., 2006).

Pregledali smo tudi 11 vzorcev, ki so bili s testom ELISA pozitivni, s testom RT-PCR v realnem času pa negativni. Možni vzroki so prisotnost zaviralcev pomnoževanja, razpad RNK pred testiranjem, nezadostna izolacija RNK iz vzorca. Prisotnost zaviralcev pomnoževanja kot vzrok lahko izključimo, saj se je pomnoževala interna kontrola LUC RNA. Verjetno je kriva nezadostna specifičnost testa ELISA, ki je po naših izračunih 94,24 % in torej še vedno obstaja 6% možnost, da je prišlo do navzkrižne pozitivne reakcije s katero drugo skupino mikroorganizmov (De Bruin in sod., 2006) in navsezadnje so bili med našimi preiskovanimi vzorci tudi takšni, kjer smo dokazali rotaviruse, adenoviruse in

astrovirusive, kar bi lahko prispevalo k lažno pozitivnim rezultatom. Možna je tudi sprememba nukleotidnega zaporedja v polimerazni regiji virusne RNA, kjer je nato med reakcijo pomnoževanja prišlo do neujemanj na kritičnih mestih, kamor bi se morali vezati začetni oligonukleotidi in je bilo posledično pomnoževanje neuspešno.

5.3 OBCUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST TESTA ELISA RIDASCREEN®

Po analizi 53 vzorcev so dobljeni rezultati nakazovali občutljivost 50 % in specifičnost 95,6 %. Toda na podlagi teh rezultatov nikakor ne moremo zaključiti, da je test ELISA RIDASCREEN® bolj zanesljiv od testa ELISA IDEIA™. Da bi lahko naredili take zaključke, bi morali z obema testoma preveriti iste vzorce in vključiti večje število vzorcev. Med vzorci vključenimi v raziskavo smo zajemali tudi take, ki so bili pozitivni na prisotnost rotavirusov, adenovirusov in astrovirusov.

Nekatere tuje raziskave poročajo o slabši občutljivosti in specifičnosti testa ELISA RIDASCREEN® v primerjavi s testom ELISA IDEIA™. V Veliki Britaniji so med leti 2004, 2005 in 2006 zbrali 2254 vzorcev in jih testirali z obema testoma ELISA in izbrali klasično RT-PCR kot »zlati standard«. V raziskavo so zajeli tako sporadične primere gastroenteritisa kot tudi izbruhe. Prav tako so vključevali vzorce, pri katerih so dokazali tudi adenoviruse, rotaviruse, astroviruse, sapoviruse ter bakterijo *Clostridium difficile*. Prišli so do zaključkov, da sta občutljivost in specifičnost boljša pri testu ELISA IDEIA™. Razlogi, ki so jih navedli, so bili predvsem, da test ELISA RIDASCREEN® zajema manj genskih tipov norovirusov, kot pa test ELISA IDEIA™. Test ELISA RIDASCREEN® namreč slabo zaznava norovirusne genotipe GI.2, GI.6, GII.1, GII.3, GII.7, genotipe GI.4, GI.5 in GII.6 pa sploh ne. Z nobenim od navedenih testov pa se ne da določiti genotipe GI.7, GII.8 in GIV.1. Razlika med obema testoma ELISA je bila manj očitna pri primerjavi zaznavanja genotipa GII.4, kjer sta bila testa enako dobra. To je tudi pričakovano, saj je genotip GII.4 norovirusov trenutno najbolj pogost povzročitelj bolezni gastroenteritisa (Gray in sod., 2007). V Sloveniji so med leti 2001 in 2008 izvedli raziskavo v kateri so z metodo RT-PCR spremljali pojavljanje različnih norovirusnih genotipov. Ugotovili so, da je GII.4 genotip najbolj pogost, vendar pa so se pojavljali tudi genotipi GII.1, GII.2, GII.3 in GII.7 (Poljšak-Prijatelj in sod., 2008).

V Avstraliji so naredili preiskavo s 130 vzorci bolnikov in izračunali 47 % občutljivost in 71% specifičnost testa ELISA RIDASCREEN[®] v primerjavi z RT-PCR. 7 vzorcev je bilo poleg norovirusov pozitivnih še na rotaviruse, sapoviruse, adenoviruse ter astroviruse (Dimitriadis in Marshall, 2005).

Po drugi strani pa nekateri raziskovalci poročajo o višji specifičnosti in občutljivosti testa ELISA RIDASCREEN[®] v primerjavi s testom ELISA IDEIA[™]. Izvedli so raziskavo v katero so vključili 288 vzorcev bolnikov z gastroenteritisom, pri tem niso izključevali takih, ki so poleg norovirusov kazali okužbo še z drugimi virusnimi povzročitelji. Primerjali so oba testa ELISA z metodo RT-PCR in izračunali občutljivost 60,6 % in specifičnost 100 % za test ELISA IDEIA[™] ter 80,3 % občutljivost in 100 % specifičnost za test ELISA RIDASCREEN[®] (Castriciano in sod., 2006).

6 SKLEPI

V vzorcih iztrebkov bolnikov z gastroenteritisom smo določili noroviruse in ugotovili, da se rezultati uporabljenih metod med seboj precej razlikujejo.

Analizirali smo 382 vzorcev, ki so bili predhodno s testom ELISA IDEIATM negativni. 70 vzorcev ali 18,32 %, je bilo po testiranju z RT-PCR v realnem času pozitivnih. Sklepamo lahko, da je RT-PCR v realnem času bolj občutljiva in specifična metoda in z njo določimo virusno RNA. Metoda RT-PCR v realnem času je hitra, bistveno je zmanjšana možnost kontaminacije in je zato primerna za uporabo v diagnostične namene.

Večino norovirusnih pozitivnih rezultatov smo dokazali pri bolnikih iz Klinike za infekcijska in vročinska stanja, UKC, kar je bilo tudi pričakovano, saj tja prihajajo ljudje, pri katerih sumijo na virusne in druge okužbe. Večina bolnikov je bilo starejših od 15 let.

Največ okužb je bilo v mesecu decembru, z začetkom naraščanja okužb v novembru in začetkom padanja v januarju. To ni nobeno presenečenje, saj so po tudi drugih raziskavah sodeč norovirusne okužbe najbolj pogoste v zimskih mesecih.

Ker test ELISA IDEIATM ni zadosti občutljiv in specifičen, da bi predstavljal edino diagnostično metodo za določanje sporadičnih primerov gastroenteritičnih okužb, bo potrebno sčasoma zamenjati ta test z RT-PCR v realnem času.

V naši študiji smo dobili rezultate specifičnost 94,24 in občutljivost 30,67 % za test ELISA IDEIATM ter specifičnost 95,6 % in občutljivost 50 % za test ELISA RIDASCREEN[®]. Encimsko imunski komplet ELISA RIDASCREEN[®] sicer nakazuje boljše rezultate, vendar s testoma nismo pregledali istih vzorcev in v dovolj velikem številu.

7 POVZETEK

Z metodo RT-PCR v realnem času smo pregledali 382 vzorcev bolnikov z gastroenteritisom, ki so bili predhodno negativni s testom ELISA IDEIATM. Pri naboru vzorcev nismo izključevali tiste, kjer smo določili rotaviruse, astroviruse ter adenoviruse. Uporabili smo začetne oligonukleotide in sonde s katerimi določimo najpogostejše norovirusne genotipe genske skupine II. Z molekularno metodo smo dokazali še dodatnih 70 norovirusnih pozitivnih vzorcev.

Bolniki pri katerih smo dokazali največ norovirusnih okužb so bili hospitalizirani na Kliniki za infekcijska in vročinska stanja UKC, Pediatrični kliniki UKC in Kiruršk kliniki UKC. Okuženi bolniki so bili večinoma starejši od 15 let.

Pregledali smo 266 naključno izbranih vzorcev (pri tem nismo izključevali teh, kjer smo dokazali druge virusne povzročitelje gastroenteritisa) in izračunali specifičnost in občutljivost testa ELISA IDEIATM. RT-PCR v realnem času smo uporabili kot "zlati standard". Občutljivost je znašala 30,67 %, medtem ko je bila specifičnost višja, in sicer 94,24 %. Z začetnimi oligonukleotidi in sondami za gensko skupino GI norovirusov smo preverili 11 vzorcev, ki so bili s testom ELISA IDEIATM pozitivni, z RT-PCR v realnem času pa negativni. Vsi vzorci so bili negativni tudi na prisotnost virusne genske skupine GI norovirusov.

Po pregledu 53 naključno izbranih vzorcev, ki niso izključevali ostale povzročitelje gastroenteritisa, sta bili občutljivost in specifičnost testa ELISA RIDACSREEN[®] 50 % in 95,6 %. Kot "zlati standard" smo uporabili RT-PCR v realnem času. Pregledano je bilo premajhno število vzorcev, da bi lahko prišli do signifikantnih zaključkov.

8 VIRI:

Appleton H., Buckley M., Thom B.T., Cotton J.L., Henderson S. 1977. Virus-like particles in winter vomiting disease. *Lancet*, 309: 409-411

Atmar R.L., Estes M.K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 1: 15-37

Becker K.M., Moe C.L., Southwick K.L., MacCormack J.N. 2000. Transmission of Norwalk virus during football game. *New England Journal of Medicine*, 343, 17: 1223-1227

Belliot G., Sosnovtsev S.V., Mitra T., Hammer C., Garfield M., Green K.Y. 2003. *In vitro* proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *Journal of Virology*, 77: 10957-10974

Bender MedSystems. 2007. ELISA technology. Vienna, Bender Medsystems
<http://www.bendermedsystems.com/elisa--22> (1. oktober 2009): 1-1

Berke T., Matson D.O. 2000. Reclassification of the *Caliciviridae* into distinct genera and exclusion of hepatitis E from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Archives of Virology*, 145:1421-1436

Billgren M., Christenson B., Hedlund K.O. 2002. Epidemiology of Norwalk-like human caliciviruses in hospital outbreaks of acute gastroenteritis in the Stockholm area in 1996. *Journal of Infection*, 44: 26-32

Biosystem Development. 2007. Elisa. Madison. Biosystem Development:
<http://thefutureofthings.com/articles.php?itemId=37/56/> (17.september 2009): 1-1

Black D.N, Burroughs J.N., Harris T.J.R., Brown F. 1978. The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature*, 274: 614-615

De Bruin E., Duizer E., Vennema H. 2006 Diagnosis of norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 137: 259-264

Burroughs J.N., Brown F. 1978. Presence of a covalently linked protein on caliciviral RNA. *Journal of General Virology*, 41: 443-446

Castilho J.G, Munford V., Resque R.H., Fagundes-Neto U., Vinje J., Racz M.L. 2006. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3947-3953

Castriciano S., Luinstra K., Petrich A., Smieja M., Lee C., Jang D., Portillo E., Chernesky M. 2006. Comparison of the RIDASCREEN[®] norovirus enzyme immunoassay to IDEIA

NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *Journal of Virological Methods*, 141: 216-219

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

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

Chakravarty S., Hutson A.M, Estes M.K, Prasad B.V. 2005. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *Journal of Virology*; 79: 554-568

Chiba S.Y., Sakuma R., Kogasaka R., Akihara M., Horino K., Nakao T., Fukui S. 1979. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *Journal of Medical Virology*, 4: 249-254

Chiba S.Y., Sakuma R., Kogasaka R., Akihara M., Terashima H., Horino K., Nakao T. 1980. Fecal shedding of virus in relation to the days of illness in infantile gastroenteritis due to calicivirus. *Journal of Infectious Diseases*, 142: 247-249

Class C.J.E., Melchers J.G.W., Van den Brule J.C.A. 2007. The role of real-time PCR in routine microbial diagnostics. V: *Real-Time PCR in microbiology: From diagnosis to characterization*. Mackay M. I. (ed.). Wymondham, Caister Academic: 231-269

Cubitt W.D., McSwiggan D.A., Arstall S. 1980. An outbreak of calicivirus infection in a mother and baby unit. *Journal of Clinical Pathology*, 33: 1095-1098

Cubitt W.D., McSwiggan D.A., Moore W. 1979. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *Journal of Clinical Pathology*, 32: 786-793

Dai Y.C., Nie J., Zhang X.F., Li Z.F., Bai Y., Zeng Z.R. 2004. Seroprevalence of antibodies against noroviruses among students in a Chinese Military Medical University. *Journal of Clinical Virology*, 42, 10: 4615-4619

Dimitriadis A., Marshall J.A. 2005. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of norovirus in outbreak specimens. *European Journal of Clinical Microbiology*, 24: 615-618

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

Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H. 1971. Transmission of infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *Journal of Infectious Diseases*, 123: 307-12

Dolin R., Reichman R.C., Roessner K.D., Tralka T.S., Schooley R.T., Gary W., Morens D. 1982. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, 2, 146: 184-189

Duizer E., Bijkerk P., Rockx B., De Groot A., Twisk F., Koopmans M. 2004. Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 8: 4538-4543

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill III F.R., Smith T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 165–256.

Garcia C., DuPont H.L., Long Z.K., Santos I.J., Ko P. 2006. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 8: 2997-3000

Gordon I., Ingraham S.H., Korns R.F. 1947. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *Journal of Experimental Medicine*, 86, 5: 409-422

Gray J.J., Kohli E., Ruggeri F.M., Vennema H., Sánchez-Fauquier A., Schreier E., Gallimore C.I., Iturriza Gomara M., Giraudon H., Pothier P., Di Bartolo I., Inglese N., De Bruin E., Van der Veer B., Moreno S., Montero V., De Llano M. C., Höhne M., Diedrich S. M. 2007. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 10: 1349–1355

Greenberg H.B., Valdesuso J.R., Kalica A.R., Wyatt R.G., McAuliffe V.J., Kapikian A.Z., Chanock R.M. 1981. Proteins of Norwalk virus. *Journal of Virology*, 37: 994-999

Greenberg H.B., Valdesuso J., Kapikian A.Z., Chanock R.M., Wyatt R.G., Szmuness W. 1979. Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. *Infection and Immunity*, 26, 1: 270-273

Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J., Thiel H.J. 2000. Taxonomy of the Caliciviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl.2: S322-S330

Hardy E.M. 2005. Norovirus protein structure and function. *Federation of European Microbiological Societies*, 253: 1-8

Hutson A.M, Atmar R.L, Estes M.K. 2004. Norovirus disease: Changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiology*, 12, 6: 279-287

ICMG. 2009. What is real time PCR. Montreal, ICMG-Ion Channel Media Group: <http://www.rt-pcr.com/> (30. sept. 2009): 1-2

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

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

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

Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanok R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10: 1075-1081

Kaplan J.E., Gary G.W., Baron R.C., Singh N., Schonberger L.B., Feldman R., Greenberg H.B. 1982. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Annals of Internal Medicine*, 96, 6: 756-761

KCDC. 2007. Noroviruses. Virus Sequence Database. Seoul, KCDC – Korea center for disease control and prevention: http://cdc.labkm.net/vsd/database/gene_search_6.jsp?orgId=6&reset=1 (16.september 2009): 1-1

Koopmans M., Van Strien E., Vennema H. 2003. Norwalk- and Sapporo-like viruses (human caliciviruses). *Molecular epidemiology of human caliciviruses. V: Viral gastroenteritis.* Desselberger U., Gray J. (eds.). Amsterdam, Elsevier : 523-554

Kroneman A., Harris J., Vennema H., Duizer E., Van Duynhoven Y., Gray J., Iturriza M., Böttiger B., Falkenhorst G., Johnsen C., Von Bonsdorff C.H., Maunula L., Kuusi M., Pothier P., Gallay A., Schreier E., Koch J., Szücs G., Reuter G., Krisztalovics K., Lynch M., McKeown P., Foley B., Coughlan S., Ruggeri F. M., Bartolo I. Di, Vainio K., Isakbaeva E., Poljsak-Prijatelj M., Hocevar Grom A., Bosch A., Buesa J., Sanchez Fauquier A., Hernández Pezzi G., Hedlund K.O. 2007. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *Journal of Public Health*, 30, 1: 82-90

Kroneman A., Verhoef L., Harris J., Vennema H., Duizer E., Van Duynhoven Y., Gray J., Iturriza M., Böttiger B., Falkenhorst G., Johnsen C., Von Bonsdorff C.H., Maunula L., Kuusi M., Pothier P., Gallay A., Schreier E., Höhne M., Koch J., Szücs G., Reuter G., Krisztalovics K., Lynch M., McKeown P., Foley B., Coughlan S., Ruggeri F.M., Di Bartolo I., Vainio K., Isakbaeva E., Poljsak-Prijatelj M., Grom A.H., Mijovski Zimsek J., Bosch A., Buesa J., Fauquier A.S., Hernández-Pezzi G., Hedlund K.O., Koopmans M. 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 9: 2959-2965

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

L'Homme Y., Sansregret R., Plante-Fortier É., Lamontagne A.M., Ouardani M., Lacroix G., Simard C. 2009. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of *Caliciviridae*. *Virus Genes*, 39: 66-75

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

Lopman B.A., Reacher M.H., Vipond I.B., Sarangi J., Brown D.W. 2004a. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 3: 318-324

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

Marin J. 2005. Neposredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 116-126

Martella V., Lorusso E., Decaro N., Elia G., Radogna A., D'Abramo M., Desario C., Cavalli A., Corrente M., Camero M., Germinario C.A., Bányai K., Di Martino B., Marsilio F., Carmichael L.E., Buonavoglia C. 2008. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 1306-1308

Martin S., Andersson Y., Hedlund K.O., Giesecke J. 2004. New norovirus surveillance system in Sweden. *Eurosurveillance*, 8, 39: 7-10

Masako H., Kuzuya M., Fujii R., Ogura H., Yamada M. 2005. Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by noroviruses in Okayama, Japan. *Journal of Medical Virology*, 77: 282-289

McSwiggan D.A., Cubitt D., Moore W. 1978. Calicivirus associated with winter vomiting disease. *Lancet*, 1, 8075: 1215-1215

Medici M.C., Martinelli M., Ruggeri F.M., Abelli L.A., Bosco S., Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Calderaro A., Chezzi C., Dettori G. 2005. Broadly reactive nested reverse transcription-PCR using an internal RNA standard control for detection of Noroviruses in stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 3772-3778

Medici M.C., Martinelli M., Abelli L.A., Ruggeri M.F., Di Bartolo I., Arcangeletti M.C., Pinardi F., De Conto F., Izzi G., Bernasconi S., Chezzi C., Dettori G. 2006. Molecular

epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northern Italy. *Journal of Medical Virology*, 78, 11: 1486-1492

Moreno-Espinosa S., Farkas T., Jiang X. 2004. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Pediatric Infectious Diseases*, 15: 237-245

Okada M., Tanaka T., Oseto M., Takeda N., Shinozaki K. 2006. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Archives of Virology*, 151, 8: 1635-1641

Parrino T.A., Schreiber D.S., Trier J.S., Kapikian A.Z., Blacklow N.R. 1977. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *New England Journal of Medicine*, 197, 2: 86-89

Patel M.M., Widdowson M.A., Glass R.I., Akazawa K., Vinje J., Parashar U.D. 2008. Systematic Literature Review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 14: 1224-1231

Peasey A.E., Ruiz Palacios G.M., Quigley M., Newsholme W., Martinez J., Rosales G. 2004. Seroepidemiology and risk factors for sporadic norovirus/Mexico strain. *Journal of Infectious Diseases* 189, 11: 2027-2036

Pelosi E., Lambden P.R., Caul E.O., Liu B., Dingle K., Deng Y. 1999. The seroepidemiology of genogroup 1 and genogroup 2 Norwalk-like viruses in Italy. *Journal of Medical Virology*, 58, 1: 93-99

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

Poljšak-Prijatelj M., Zimšek Mijovski J., Kovač K., Steyer A., Hočevar Grom A. 2008. Detection and molecular epidemiology of Calicivirus outbreaks in Slovenia from 2001 to 2008. V: *Microbiology for today*, Portorož, 19-22 nov. 2008. Barlič Maganja D., Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 66-66

Prasad B.V.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286, 5438: 287-290

Rabenau H.F., Sturmer M., Buxbaum S., Walczok A., Preiser W. 2003. Laboratory diagnosis of Norovirus: Which method is the best? *Intervirology*, 46: 232-238

Real Time PCR: The TaqMan® Method. 2003. Davidson, Davidson College, Department of Biology:
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimpcr.htm> (29.sept.2009)

Rockx B., De Wit M., Vennema H., Vinje J., De Bruin E., Van Duynhoven Y. 2002. Natural history of human calicivirus infection: A prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 35, 3: 246–253

Shiota T., Okame M., Takanashi S., Khamrin P., Takagi M., Satou K., Masuoka Y., Yagy F., Shimizu Y., Kohno H., Mizuguchi M., Okitsu S., Ushijima H. 2007. Characterization of a broadly reactive monoclonal antibody against norovirus genogroups I and II: Recognition of a novel conformational epitope. *Journal of Virology*, 81: 12298–12306

Smith W.A., Skilling E.D., Castello D. J. 2004. Ice as a reservoir for pathogenic human viruses: specifically, caliciviruses, influenza viruses, and enteroviruses. *Medical Hypotheses*, 63: 560-566

Teunis P.F., Moe C.L., Liu P., Miller S.E., Lindesmith L., Baric R.S. 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 80, 8: 4538-4543

Troeger H., Loddenkemper C., Schneider T., Schreier E., Epple H.J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. 2009. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 58: 1070-1077

Trottier Y.L., Houde A., Buenaventura E., Muller P., Brassard J., Christensen K., Liu J. 2006. Concentration of norovirus genogroups I and II from contaminated oysters and their detection using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. V: *Compendium of analytical methods*. Vol.5. Ottawa, Health Canada
<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume5/index-eng.php>
(15.oktober): 9-14

Turcios-Ruiz R.M., Axelrod P., St John K., Bullitt E., Donahue J., Robinson N. 2008. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *Journal of Pediatrics*, 153, 3: 339-344

Turner J.R. 2003. Functional morphology of the intestinal mucosae: From crypts to tips. V: *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell*. Hecht A.G. (ed.). Washington, American Society for Microbiology : 1-22

Wang Q.H., Han M.G., Cheetham S., Souza M., Funk J.A., Saif L.J. 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 11: 1874-1881

Widdowson M.A., Sulka A., Bulens S.N., Beard R.S., Chaves S.S., Hammond R. 2005. Norovirus and foodborne disease. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 11, 1: 95-102

Wong M.L., Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39: 1-11

Wu T.C., Liu H.H., Chen Y.J., Tang R.B, Hwang B.T., Yuan H.C.. 2008. Comparison of clinical features of childhood Norovirus and rotavirus gastroenteritis in Taiwan. *Journal of the Chinese Medical Association*, 71, 11: 566-57

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem somentorici, asist. strok. svet. dr. Mateji Poljšak – Prijatelj za številne nasvete, potrpežljivost, izkazano zaupanje ter dano priložnost.

Iskrena hvala doc. dr. Miroslavu Petrovcu in prof. dr. Tatjani Avšič Županc za sodelovanje in strokoven ter hiter pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi delovni mentorici Janet Zimšek Mijovski za pomoč pri opravljanju praktičnega dela, za vse pojasnjene nerazumljivosti, neštete odgovore in skrben pregled diplomske naloge.

Za ves trud in koristne napotke pri opravljanju in pisanju diplomske naloge se zahvaljujem tudi Andreju Steyerju.

Za prijetne pogovore, sproščeno vzdušje ter pomoč v laboratoriju se zahvaljujem Ireni Šest.

Hvala tudi Barbari Šoba za prijateljsvo in nesebično deljenje znanja ter izkušenj.

Mami in ati, sama beseda "hvala" ne bi bila dovolj, da povem koliko mi pomenita in koliko sta mi skozi vsa ta leta pomagala. Skupaj smo se veselili vseh uspehov in jokali ob neuspehih. Veliko sta me naučila o življenju, o vztrajanju, o tem kaj je res pomembno in za kaj se je vredno boriti.

Matejka in Benjamin, vajino prijateljstvo me je držalo pokonci ob slabih dneh in vedno sem vedela, da se za dober nasvet in spodbuden nasmeh lahko obrnem na vaju. Hvala tudi ostalim članom družine Bardorfer.

Za prijetna študijska leta se zahvaljujem tudi Vesni V., Vesni M., Tini Ž. in Tini Đ. Brez vas bi bilo res dolgčas. Hvala za pomoč pri študiju, za sproščujoče pogovore in veliko smeha.

Hvala vsem, ki ste mi stali ob strani.