

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Klementina ŽNUDERL

**ROTAVIRUSNI GENOTIPI PRI  
HOSPITALIZIRANIH OTROCIH V LJUBLJANSKI  
REGIJI V LETU 2008**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Klementina ŽNUDERL

**ROTAVIRUSNI GENOTIPI PRI HOSPITALIZIRANIH OTROCIH V  
LJUBLJANSKI REGIJI V LETU 2008**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ROTAVIRUS GENOTYPE IN HOSPITALIZED CHILDREN IN  
LJUBLJANA REGION IN YEAR 2008**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miroslava Petrovca, za somentorja dr. Andreja Steyerja in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič - Županc.

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec

Somentor: dr. Andrej Steyer

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič - Županc

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR - BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC

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

Član: dr. Andrej STEYER

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

Član: prof. dr. Tatjana AVŠIČ - ŽUPANC

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Klementina Žnuderl

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7 : 578.823 : 578.5 (043)=163.6
- KG rotavirusi/akutni gastroenteritis pri otrocih/ljubljanska regija/epidemiologija/Rotarix/RotaTeq/genotipizacija/RT-PCR/vgnezdna PCR/ genotip G (VP7)/genotip P (VP4)
- AV ŽNUDERL, Klementina
- SA PETROVEC, Miroslav (mentor)/STEYER, Andrej (somentor)/AVŠIČ - ŽUPANC Tatjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2010
- IN ROTAVIRUSNI GENOTIPI PRI HOSPITALIZIRANIH OTROCIH V LJUBLJANSKI REGIJI V LETU 2008
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VIII, 53 str., 8 pregl., 14 sl., 50 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- Al Rotavirusi so najpogostejši povzročitelji akutnega gastroenteritisa pri otrocih do 5. leta starosti po vsem svetu. Letno povzročijo več kot 500.000 smrti, predvsem v deželah v razvoju. Zaradi velike obolevnosti in spreminjanja rotavirusnih genotipov, je za razvoj učinkovitih cepiv nujno spremljanje molekularne epidemiologije rotavirusov. V diplomski nalogi smo spremljali pojavljanje rotavirusnih genotipov pri hospitaliziranih otrocih starih do 5 let v ljubljanski regiji v letu 2008. Ugotovili smo, da je bilo največ obolelih otrok starih med 1. in 2. letom. V tem starostnem razredu je bila tudi genotipska raznolikost rotavirusov največja. Največ okužb se je pojavilo v zimskih in zgodnjih spomladanskih mesecih, z vrhom v mesecu januarju. V letu 2008 je bil tako kot prejšnja leta najpogostejši rotavirusni genotip G1P[8]. Pojavljali pa so se tudi rotavirusni genotipi G2P[4], G9P[8], G4P[8], G2P[8] in G9P[4]. Majhen delež pa so predstavljale okužbe z mešanimi genotipi: G1+G10P[8], G1+G12P[8] in G9+G12P[8].

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

- DN Dn
- DC UDC 578.7 : 578.823 : 578.5 (043)=163.6
- CX rotaviruses/acute gastroenteritis in children/ Ljubljana region/  
epidemiology/Rotarix/RotaTeq/genotyping/RT-PCR/multiplex-nested PCR/  
genotype G (VP7)/genotype P (VP4)
- AU ŽNUDERL, Klementina
- AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/STEYER, Andrej (co-advisor)/AVŠIČ -  
ŽUPANC Tatjana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental  
Programme in Microbiology
- PY 2010
- TI ROTAVIRUS GENOTYPE IN HOSPITALIZED CHILDREN IN  
LJUBLJANA REGION IN YEAR 2008
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO VIII, 53 p., 8 tab., 14 fig., 50 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Rotaviruses are the most common cause of acute gastroenteritis in children up to five years of age worldwide. Annually rotaviruses cause more than 500 000 deaths, mostly in developing countries. Due to high morbidity and alteration of rotavirus genotypes, it is vital for the development of effective vaccines to strictly monitor the molecular epidemiology of rotaviruses. The emergence of rotavirus genotypes was monitored in hospitalized children aged up to five years in the Ljubljana region in 2008. The most of sick children included in our study were aged between 1 and 2 years. In the same age group the highest genotypic diversity of rotaviruses was determined. Most infections occurred in the winter and early spring months with a peak in January. As already shown in previous years, the most common genotype in 2008 was G1P[8]. Genotypes G2P[4], G9P[8], G4P[8], G2P[8] and G9P[4] were also appearing. Only few infections were caused by mixed rotavirus genotypes: G1+G10P[8], G1+G12P[8] and G9+G12P[8].

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>II</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED.....	3
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV .....	4
2.3 ZGRADBA.....	5
2.4 PRENOS IN PATOGENEZA .....	6
<b>2.4.1 Sistemska rotavirusna okužba.....</b>	<b>7</b>
2.5 KLINIČNI ZNAKI IN ZDRAVLJENJE.....	8
2.6 IMUNSKI ODGOVOR.....	9
2.7 EPIDEMIOLOGIJA.....	10
<b>2.7.1 Molekularna epidemiologija.....</b>	<b>13</b>
2.7.1.1 Porazdelitev rotavirusnih genotipov po svetu .....	14
2.7.1.2 Porazdelitev rotavirusnih genotipov v Evropi.....	15
2.7.1.3 Porazdelitev rotavirusnih genotipov v Sloveniji .....	17
2.8 ROTAVIRUSNA CEPIVA .....	17
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>22</b>

3.1	MATERIALI .....	22
3.1.1	Klinični vzorci .....	22
3.1.2	Materiali za osamitev celokupne RNA s Trizolom .....	22
3.1.3	Reagenti za enostopenjsko RT-PCR .....	22
3.1.4	Reagenti za vgnezdno PCR .....	23
3.1.5	Materiali za agarozno gelsko elektroforezo .....	23
3.1.6	Ostala laboratorijska oprema in aparature uporabljene pri delu .....	23
3.2	METODE .....	24
3.2.1	Osamitev celokupne RNA s Trizolom .....	24
3.2.2	Enostopenjska RT-PCR .....	25
3.2.3	Vgnezdna PCR .....	27
3.2.4	Agarozna gelska elektroforeza .....	29
4	REZULTATI .....	31
4.1	ZNAČILNOST VZORCEV IZTREBKOV OTROK, OBOLELIH ZA ROTAVIRUSNIM GASTROENTERITISOM .....	31
4.2	PORAZDELITEV ROTAVIRUSNIH GENOTIPOV G IN P .....	34
5	RAZPRAVA .....	38
5.1	ZNAČILNOST VZORCEV IZTREBKOV OTROK, OBOLELIH ZA ROTAVIRUSNIM GASTROENTERITISOM .....	38
5.2	PORAZDELITEV ROTAVIRUSNIH GENOTIPOV G IN P .....	40
6	SKLEPI .....	44
7	POVZETEK .....	45
8	VIRI .....	47

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1.</b> Osnovne lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov pri RT - PCR (Iturriza Gómara in sod., 2004; Gentsch in sod., 1992).....	26
<b>Preglednica 2.</b> Začetne in končne koncentracije reagentov za RT –PCR.....	26
<b>Preglednica 3.</b> Temperaturni in časovni potek RT – PCR.....	27
<b>Preglednica 4.</b> Osnovne lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov za določanje genotipov G pri vgnezdni PCR (Gouvea in sod., 1990, Iturriza Gómara in sod., 2004).....	27
<b>Preglednica 5.</b> Osnovne lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov za določanje genotipov P pri vgnezdni PCR (Gentsch in sod., 1992, Iturriza Gómara in sod., 2000).....	28
<b>Preglednica 6.</b> Začetne in končne koncentracije reagentov za določanje genotipov G pri vgnezdni PCR.....	28
<b>Preglednica 7.</b> Začetne in končne koncentracije reagentov za določanje genotipov P pri vgnezdni PCR.....	29
<b>Preglednica 8:</b> Temperaturni in časovni potek vgnezdene PCR.....	29



**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1.</b>	Zgradba rotavirusa (Pesavento in sod., 2006).....	5
<b>Slika 2.</b>	Ocenjena pojavnost smrti kot posledica rotavirusnih okužb na 100.000 otrok mlajših od 5 let po svetu (Chandran in sod., 2010). .....	10
<b>Slika 3.</b>	Geografska raznolikost pojavljanja rotavirusnih genotipov po svetu (O`Ryan, 2009). .....	14
<b>Slika 4.</b>	Delež analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, glede na pošiljatelje v ljubljanski regiji v letu 2008.....	31
<b>Slika 5.</b>	Delež analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, glede na spol v ljubljanski regiji v letu 2008 .....	32
<b>Slika 6.</b>	Starostna porazdelitev otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008 .....	32
<b>Slika 9.</b>	Primerjava števila analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008 s številom prijavljenih primerov rotavirusnih okužb v ljubljanski regiji v letu 2008 (IVZ RS, 2008) .....	34
<b>Slika 10.</b>	Pogostost pojavljanja rotavirusnih genotipov G pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008 .....	35
<b>Slika 11.</b>	Pogostost pojavljanja rotavirusnih genotipov P pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008 .....	35
<b>Slika 12.</b>	Porazdelitev rotavirusnih genotipov pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008.....	36
<b>Slika 13.</b>	Porazdelitev rotavirusnih genotipov pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, po starostnih skupinah v ljubljanski regiji v letu 2008.....	37
<b>Slika 14.</b>	Porazdelitev rotavirusnih genotipov pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, po mesecih v ljubljanski regiji v letu 2008 .....	37

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

cDNA	- komplementarna DNA (ang.: complementary DNA)
CD4	- površinska molekula na celicah T pomagalkah
CD8	- površinska molekula na citotoksičnih celicah T
ddH <sub>2</sub> O	- demineralizirana destilirana voda
DNA	- deoksiribonukleinska kislina (ang.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	- deoksinukleotid trifosfat
IgA	- imunoglobulin (protitelesa) razreda A
IgG	- imunoglobulin (protitelesa) razreda G
NSP	- nestrukturna beljakovina (nagl.: non structural protein)
mRNA	- informacijska RNA (ang.: messenger RNA)
PCR	- verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo (ang.: polymerase chain reaction)
RNA	- ribonukleinska kislina (ang.: ribonucleic acid)
RT – PCR	- obratno prepisovanje in verižna reakcija pomnoževanja s polimerazo (ang.: polymerase chain reaction)
T <sub>m</sub>	- temperatura tališča (ang.: melting point)
U	- enota za encimsko aktivnost
VP	- virusna beljakovina (angl.: viral protein)

## 1 UVOD

Rotaviruse so prvič odkrili leta 1973. Njihovo ime izhaja iz kolesu podobne strukture (kolo, lat.: *rota*) (Bishop, 2009). Uvrščamo jih v rod *Rotavirus* in v družino *Reoviridae* (Estes in Kapikian, 2007). Rotavirusi so ikozaedrični virusi brez ovojnice, s troslojno kapsido in z genomom, ki ga sestavlja 11 odsekov dvojnovijačne RNA (Pesavento in sod., 2006). So najpogostejši povzročitelji akutnega gastroenteritisa pri novorojenčkih in otrocih do 5. leta starosti. Inkubacijska doba traja od 1 do 3 dni. Pri obolelih se najpogosteje pojavijo povišana telesna temperatura, bruhanje in močna vodena driska, ki po 4 – 7 dneh izzveni (Chandran in sod., 2010). Za zdravljenje se najpogosteje uporablja oralna rehidracijska raztopina (angl.: ORS) (Estes in Kapikian, 2007). Rotavirusne okužbe se pojavljajo povsod po svetu, s tem da v državah v razvoju smrtnost zaradi rotavirusnih okužb predstavlja kar 5 % vseh smrti pri otrocih do 5. leta starosti (Chandran in sod., 2010). Pri obolelih kar 90 % vseh rotavirusnih okužb povzročijo rotavirusni genotipi G1P[8], G2[4], G3P[8] ter G4P[8]. V okoljih z zmernim podnebjem se rotavirusne okužbe pojavljajo sezonsko, v okoljih s tropskim podnebjem pa preko vsega leta. Zaradi velikega števila obolelih za rotavirusnimi okužbami, so razvili ustrezno cepivo. Trenutno sta v uporabi predvsem dve cepivi, in sicer RotaTeq (Merck Vaccine Division) in Rotarix (GlaxoSmithKlein) (Greenberg in Estes, 2009).

### 1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil določiti rotavirusne genotipe pri hospitaliziranih otrocih starih do pet let, ki so oboleli za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008. Rotavirusne okužbe obolelih otrok so bile sprva dokazane z encimsko imunsko metodo in z elektronsko mikroskopijo. Nato smo z genotipizacijo teh vzorcev poskušali določiti pogostost pojavljanja posameznih rotavirusnih genotipov in primerjati porazdelitev le-teh po posameznih starostnih skupinah otrok in po mesecih v letu 2008. Prav tako smo primerjali rotavirusne genotipe, ki so se pojavljali v Sloveniji z rotavirusnimi genotipi, ki se pojavljajo v ostalih evropskih državah in po svetu.

Pričakovali smo, da bo pogostost pojavljanja posameznih genotipov podobna kot prejšnja leta, z najpogostejšim rotavirusnim genotipom G1P[8]. Prav tako smo predvidevali, da bo največja porast rotavirusnih okužb v poznih zimskih mesecih in da bo največ obolelih med prvim in drugim letom starosti. Predvidevali smo tudi, da je pojavnost posameznih rotavirusnih genotipov drugod v Evropi in po svetu podobna.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

V preteklosti je veliko novorojenčkov in mlajših otrok umrlo zaradi driske. Vzroke zanjo so pripisovali bakterijskim okužbam. Leta 1929 je Zahorsky prvi opisal simptome gastroenteritisa pri dojenčkih in mlajših otrocih. Prav tako je predlagal, da so lahko povzročitelji drisk tudi virusne okužbe. Po letu 1940 se je smrtnost otrok kot posledica drisk, zaradi izboljšanja higiene, osveščanja mater, pravnega ravnanja z izločki obolelih in napredka pri zdravljenju v bolnišnicah, zmanjšala (Bishop, 2009).

Leta 1943 sta Light in Hodes intranazalno cepila teleta s filtriranimi izločki obolelih dojenčkov in s tem sprožila drisko tudi pri teletu, vendar povzročiteljev nista mogla namnožiti na celičnih kulturah. Šele tri desetletja kasneje (1974) so v shranjenih vzorcih dokazali rotaviruse (Bishop, 2009).

Leta 1947 so rotaviruse prvič opisali pri miših. Mišji rotavirusni sevi so bili tudi prvi, ki so jih v letu 1963 opazovali z elektronskim mikroskopom. Istega leta so podobne morfološke lastnosti opazili tudi pri vzorcih izločkov odvzetih obolelim opicam in 6 let kasneje tudi pri izločkih obolelih telet (Ward in sod., 2008).

Leta 1973 pa so Bishop in sodelavci z elektronskim mikroskopom v resicah tankega črevesja otrok, obolelih za akutnim gastroenteritisom, prvič odkrili človeške rotaviruse. Opisali so jih kot okrogle kolesu podobne viruse (kolo, lat.: *rota*), iz česar izhaja tudi njihovo ime - rotavirusi. V sledečih letih so z rezultati različnih raziskav dokazali, da so prav rotavirusi glavni vzrok hudih drisk pri otrocih po vsem svetu (Ward in sod., 2008; Bishop, 2009)

## 2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Rotaviruse uvrščamo v rod *Rotavirus* in v družino *Reoviridae*, kamor prištevamo tudi druge rodove: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Cardoreovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Seadornavirus*, *Idnoreovirus* in *Mycoreovirus* (Estes in Kapikian, 2007).

Na podlagi antigenskih lastnosti beljakovine VP6 lahko rotaviruse razdelimo na 7 seroloških skupin; od A do G. Rotavirusne skupine A, B, C povzročajo okužbe tako pri ljudeh kot pri živalih, vendar je pri ljudeh najpogostejša okužba s skupino A. Ostale rotavirusne skupine (D, E, F, G) pa povzročajo okužbe le pri živalih (Estes in Kapikian, 2007).

Rotavirusno skupino A lahko glede na reaktivnost beljakovine VP6 z dvema monoklonskima protitelesoma še dodatno razdelimo v podskupine: I, II, I+II in ne-I, ne-II. Te podskupine so v zadnjih letih na osnovi molekularne opredelitve združili v dve novo imenovani genski skupini. Genska skupina I vključuje podskupino I, genska skupina II pa vključuje ostale podskupine: II, I+II in ne-I, ne-II (Matthijnsens in sod., 2008).

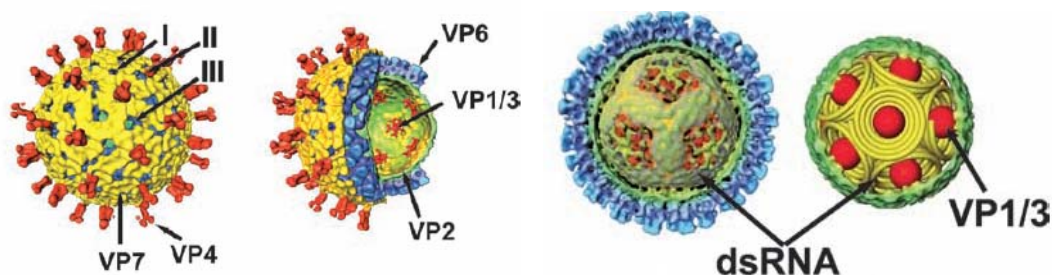
Leta 1989 so uvedli binarni klasifikacijski sistem, ki znotraj rotavirusne skupine A razlikuje med serotipi P (protezano občutljiv VP4) in serotipi G (glikoprotein VP7). Ta sistem je bil zasnovan na osnovi imunske reaktivnosti in genske strukture dveh beljakovin zunanje kapside VP4 in VP7, ki neodvisno ena od druge, izzoveta nastanek nevtralizacijskih teles (Matthijnsens in sod., 2008).

Antigensko klasifikacijo je zaradi zamudnosti, zahteve po virusni zbirki in imunskih reagentov, ki niso dostopni v vseh laboratorijih ter zaradi težavnejšega sekvenciranja, nadomestila genotipska klasifikacija, ki temelji na molekularnih metodah in rotaviruse razvršča na genotipe G (VP7) in genotipe P (VP4). Genotipi G sovpadajo s serotipi G, genotipi P pa se s serotipi P ne ujemajo. Serotip P je označen z arabsko številko, kateri sledi velika začetnica, genotip P pa ja zapisan v oglatem oklepaju za serotipom P- (P1A[8]) (Matthijnsens in sod., 2008).

Najnovejši klasifikacijski sistem razvrščanja rotavirusov temelji na vseh 11 genomskih odsekih RNA in pomeni razširitev prejšnje genotipske klasifikacije. Uvaja tudi standardni postopek za uvrstitev rotavirusnega seva v že uveljavljen ali nov genotip (Matthijnssens in sod., 2008).

### 2.3 ZGRADBA

Rotavirusi so ikozaedrični virusi brez ovojnice, ki v premeru merijo 70 – 80 nm in so sestavljeni iz troslojne kapside (Pesavento in sod., 2006).



**Slika 1.** Zgradba rotavirusa (Pesavento in sod., 2006)

Zunanjo plast kapside sestavljata beljakovini VP4 in VP7 (slika 1). Glikoprotein VP7 je glavni sestavni del zunanje plasti. V zunanji plasti kapside se tako nahaja 780 kopij beljakovine VP7 razvrščenih v 260 trimerov. Pravokotno na zunanjo plast je zasidranih 60 dimernih izrastkov beljakovine VP4. Tripsin cepi beljakovino VP4 na beljakovino VP5\* in beljakovino VP8\*. Beljakovina VP5\* tako predstavlja centralni del izrastka beljakovine VP4, beljakovina VP8\* pa preostali, notranji kroglasti področji beljakovine VP4 (Pesavento in sod., 2006).

Srednjo plast kapside sestavlja beljakovina VP6, ki je v neposrednem stiku z beljakovino VP7. Beljakovina VP6 se nahaja v 780 kopijah, ki so urejene v 260 trimerov. Skozi trimere beljakovine VP7 in beljakovine VP6 prodira 132 vodnih kanalov, ki omogočajo prehod vodnih snovi in biokemičnih substratov v in iz kapside. Beljakovina VP6 pa je tudi glavna strukturna beljakovina, ki povezuje zunanjo plast kapside z notranjo (Pesavento in sod., 2006).

Notranji sloj kapside sestoji iz 120 molekul beljakovine VP2, ki reagira z 12 kopijami encimskega kompleksa VP1/VP3. Vsakega izmed encimskih kompleksov VP1/VP3 pa obkroža dvojnovijska RNA. 11 odsekov dvojnovijske RNA sestavlja virusni genom (Pesavento in sod., 2006).

Genomski odseki kodirajo 6 strukturnih beljakovin: VP1 - VP4, VP6 in VP7 in 6 nestrukturnih beljakovin; NSP1 - NSP6. Najmanjši genomski odsek (edini izmed vseh odsekov) kodira 2 beljakovini NSP5 in NSP6. Nestrukturne beljakovine se sintetizirajo v okuženih celicah in sodelujejo pri pomnoževanju genoma ter pri sestavljanju novih virusov. Klinično najpomembnejši je enterotoksin NSP4, ki vpliva na elektrolitsko neravnovesje in posledično povzroči drisko (Pesavento in sod., 2006)

## 2.4 PRENOS IN PATOGENEZA

Rotavirusi se prenašajo po fekalno oralni poti, s tesnimi medosebnimi stiki in z okuženimi okoljskimi viri. Velika razširjenost rotavirusov v razvitih državah, kljub izboljšanju higienskih razmer, nakazuje, da imajo pri prenosu rotavirusov pomembno vlogo tudi izločki dihalnih poti pri otrocih z obolenjem zgornjih dihal (Chandran in sod., 2010).

Rotavirus se pritrdi na celično površino zrelih epitelijskih celic resic v zgornjem in srednjem delu tankega črevesja. Domnevajo, da obstajata dva načina vstopa: neposreden vstop preko plazemske membrane in endocitoza. Po vstopu v celico poteče v citoplazmi celice slačenje zunanje plasti kapside, čemur sledi prepisovanje genomske RNA (Boshuizen, 2005). Od RNA odvisna polimeraza RNA (VP1) prepíše negativno polarno enovijačno RNA vsakega genomskega odseka v pozitivno polarno enovijačno mRNA, ki se nato v viroplazmi prevede v virusne beljakovine. Sledi sinteza negativno polarne enovijačne RNA, ki se nato s pozitivno polarno enovijačno RNA poveže v dvojnovijsko RNA (Carter in Saunders, 2007). Po sestavljanju novih virusnih delcev z dvoslojno kapsido, le- ti brstijo skozi membrano endoplazmatskega retikuluma, kjer pridobijo začasno membransko ovojnico. Sledi izguba membranske ovojnice in nastanek zrelih



virusov s popolno troslojno kapsido. Zreli virusi se iz celice sprostijo z lizo ali eksocitozo (Boshuizen, 2005).

Najpogostejši klinični znak rotavirusne okužbe pri novorojenčkih in majhnih otrocih je driska. Obstaja več mehanizmov s katerimi rotavirusi povzročijo drisko:

- Malabsorpcija  
Driska se pojavi zaradi uničenja absorptivnih enterocit, zaradi zmanjšanja uravnavanja izražanja absorptivnih encimov in zaradi funkcijske spremembe v tesnih stikih med enterociti, kar vodi do uhajanja vode in elektrolitov.
- Izločanje  
Domnevajo, da je izločanje povezano z delovanjem virusnega enterotoksina NSP4, ki spodbudi črevesni živčni sistem. Enterotoksin NSP4 aktivira celične kanale Cl<sup>-</sup>, kar povzroči povečano izločanje Cl<sup>-</sup> in posledično vode.
- Ishemija črevesnih resic  
O ishemiji črevesnih resic so poročali le pri nekaterih živalskih modelih. Domnevajo, da bi bila lahko driska posledica virusno posredovanega sproščanja neznanih vazoaktivnih snovi iz okuženega epitelija, ki bi naj povzročili lokalno ishemijo črevesnih resic in posledično funkcionalno okvaro na enterocitih. Ta mehanizem je pri otrocih, okuženih z rotavirusi, zelo slabo raziskan.
- Črevesna gibljivost  
Prav tako kot ishemija črevesnih resic je tudi mehanizem črevesne gibljivosti zelo slabo raziskan, saj so bile raziskave izvedene le na nekaterih živalskih modelih (Ramig, 2004; Greenberg in Estes, 2009).

#### **2.4.1           Sistemska rotavirusna okužba**

Že pred skoraj 50 leti so v raziskavah na miših dokazali rotaviruse v različnih organih. Izsledke teh raziskav so smatrali za manj pomembne vse do uvedbe občutljivejših bioloških testov. Tako so znova pričeli s preučevanjem sistemskih rotavirusnih okužb v živalskih modelih in pri okuženih otrocih. Ugotovili so, da se pri vseh okuženih posameznikih in živalih pojavi vsaj kratko obdobje viremije, zaradi česar lahko zaznamo

viruse tudi izven črevesja v drugih tkivih. Prav tako so ugotovili, da se pri večini okuženih otrok pojavlja tudi antigenemija. Rotavirusne antigene oz. rotavirusno RNA so dokazali že v vranici, v srcu, v ledvicah, v jetrih, v mehurju, v testisih, v izločkih respiratornega trakta in v endotelijskih celicah. Na področju sistemskih rotavirusnih okužb je še veliko neznank. Med drugim še zmeraj niso jasne klinične posledice sistemske rotavirusne okužbe (Blutt in Conner, 2007; Greenberg in Estes, 2009).

## 2.5 KLINIČNI ZNAKI IN ZDRAVLJENJE

Rotavirusi lahko povzročijo simptomatsko ali nesimptomatsko okužbo. Ali bo okužba potekala simptomatsko ali nesimptomatsko, je odvisno tako od virusnih kot tudi od gostiteljevih dejavnikov. Najpomembnejši gostiteljev dejavnik je starost. Okuženi novorojenčki le redko zbolijo za simptomatsko okužbo, kajti do 3. meseca starosti jih varujejo materina protitelesa. Z rotavirusi se lahko okužijo tudi odrasli, vendar je huda simptomatska bolezen redka. Simptomatska okužba pri odraslih se lahko razvije kot posledica okužbe z nenavadnim virusnim sevom ali pri okužbi z večjo koncentracijo virusa (Greenber in Estes, 2009).

Rotavirusi povzročajo akutni gastroenteritis. Po inkubacijskem obdobju, ki traja od 1 do 3 dni, se nenadno pojavijo simptomi: povišana telesna temperatura, bruhanje in močna vodena driska. Bolezen običajno traja od 4 do 7 dni. Bolniki z blagimi simptomi nato popolnoma ozdravijo (Chandran in sod., 2010). Imunsko oslabljeni otroci in odrasli lahko razvijejo tudi kronično drisko. Pri odraslih, ki so oboleli za rotavirusno okužbo, se redkeje pojavijo simptomi, kot so: slabost, slabo počutje, glavobol, trebušni krči, driska in povišana telesna temperatura (Anderson in Weber, 2004). Najpogostejši zaplet pri rotavirusni okužbi je tako pri otrocih kot tudi pri odraslih dehidracija, ki je vzrok za več kot 90 % smrti zaradi rotavirusnih okužb. V državah v razvoju so otroci z rotavirusno okužbo ponavadi tudi podhranjeni. Kar 61 % otrok, ki umre zaradi driske, je podhranjenih. Driska namreč zmoti sposobnost absorpcije prebavil pri obolelih, kar vodi do podhranjenosti. Podhranjenost pa tudi poveča občutljivost otrok na prihodnje okužbe prebavnega trakta (Chandran in sod., 2010).

Glavni cilj pri zdravljenju rotavirusnih okužb je nadomeščanje izgubljene tekočine in elektrolitov zaradi bruhanja in driske. Svetovna zdravstvena organizacija (angl.: World Health Organisation) že od leta 1970 priporoča zdravljenje z oralno rehidracijsko raztopino (angl.: ORS). V zadnjih letih se za zdravljenje blagih in zmerno hudih rotavirusnih okužb uporablja učinkovitejša ORS z zmanjšano osmolarnostjo (245 mOSM/L) in z nižjo koncentracijo natrija (75 mmol/L) ter glukoze (75 mmol/L). V primerih hude dehidracije in šoka, ko bolnik ne more zaužiti ORS, je nujna intravenozna rehidracija v najkrajšem možnem času. Poleg ORS bi naj trajanje driske zmanjšale tudi probiotične bakterijske kulture (*Lactobacillus ssp.* GG in druge), vendar jih za zdravljenje pri otrocih ne priporočajo. Prav tako ne priporočajo zdravljenja z zdravili, ki bi naj lajšali simptome driske (loperamid, racecadotril, cholestyramine, bizmutov subsalicilat, opiat... ). Potrebne bodo še namreč nadaljnje raziskave glede učinkovitosti, varnosti in stranskih učinkov teh zdravil (Chandran in sod., 2010; Estes in Kapikian, 2007). Imunsko oslABLJENE otroke s kronično drisko zdravijo tudi z materinim mlekom, v katerem bi naj imele poleg rotavirusno specifičnih protiteles veliko vlogo tudi nespecifične bioaktivne sestavine, kot so: laktoferin, laktaderin, mucin in butirofilin (Asensi in sod., 2006).

## 2.6 IMUNSKI ODGOVOR

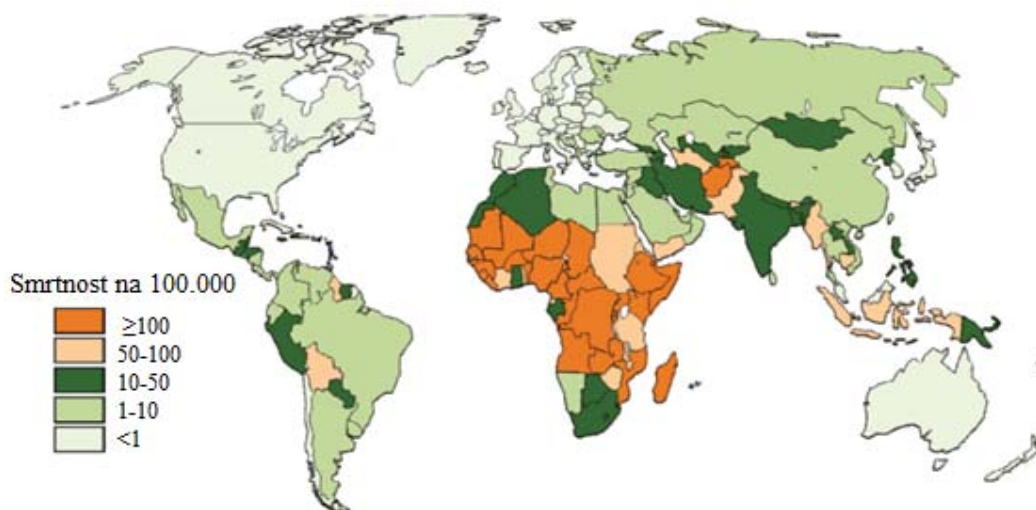
Imunski mehanizmi pri obolelih za rotavirusnimi okužbami še zmeraj niso povsem razjasnjeni. Rotavirusna okužba bi naj povzročila združeno aktivacijo sekretornih protiteles IgA in humoralnega ter celično posredovanega imunskega odgovora (Gray in sod., 2008).

Pred rotavirusno okužbo najbolj učinkovito varujejo lokalna polimerna sekretorna protitelesa IgA. Sekretorna protitelesa IgA se tvorijo proti rotavirusni beljakovini VP6. Predvidevajo, da s prenosom sekretornih protiteles IgA iz *lamina propria* v lumen tankega črevesja, le-te preprečujejo pomnoževanje rotavirusov znotraj okuženih enterocit (Ward in sod., 2008; Malik in sod., 2008). Po okužbi se proti rotavirusnima beljakovinama VP4 in VP7 pojavijo tudi nevtralizacijska protitelesa IgG in IgA, ki nevtralizirajo virus, s čimer preprečijo pritrditev in vstop virusa v celico (Ward, 2009).

Tudi celično posredovana imunost je še v fazi raziskovanj. Raziskave, izvedene na miših, so pokazale, da imajo celice B pomembno vlogo pri zaščiti po ponovni okužbi z rotavirusi. Izsledki raziskav so prav tako pokazali, da so T celice CD8+ odgovorne za skrajšanje poteka prvotne rotavirusne okužbe in da posredujejo popolno zaščito do 2 tednov po prvotni okužbi ter delno zaščito (do 3 mesecev) po ponovni okužbi (Greenber in Estes, 2009; Knippe in Howley, 2007). Celice CD4+ pomagajo oskrbovati celice CD8+ in B celice, hkrati pa bi naj tudi posredovale aktivno zaščito preko poti interferona gama po imunizaciji z rekombinantno beljakovino VP6. V prihodnosti bodo tako potrebne še nadaljnje raziskave glede podrobnejše vloge CD4+ in CD8+ T celic pri zaščiti pred rotavirusnimi okužbami (Greenberg in Estes, 2009; Ward in sod., 2008)

## 2.7 EPIDEMIOLOGIJA

Rotavirusi so najpogostejši povzročitelji akutnega gastroenteritisa pri otrocih do 5. leta starosti po vsem svetu. Ocenjujejo namreč, da letno za rotavirusnim gastroenteritisom zboli več kot 14 milijonov otrok, od tega jih 24 milijonov obiše zdravnika, 2,4 milijona otrok pa je hospitaliziranih. Najbolj zastrašujoč je podatek, da letno zaradi rotavirusnih okužb umre več kot 500.000 otrok, kar predstavlja kar 5 % vseh smrti pri otrocih do 5. leta starosti (Chandran in sod., 2010).



**Slika 2.** Ocenjena pojavnost smrti kot posledica rotavirusnih okužb na 100.000 otrok mlajših od 5 let po svetu (Chandran in sod., 2010)

Rotavirusne okužbe se pojavljajo tako pri otrocih v razvitih državah kot tudi pri otrocih, ki živijo v državah v razvoju. Višji higienski standardi v razvitih državah namreč ne vplivajo bistveno na zmanjšanje primerov rotavirusnih okužb. Vendar je opazna velika razlika v umrljivosti, saj se kar 85 % vseh smrtnih primerov zaradi rotavirusnih okužb pojavi pri otrocih v državah v razvoju, najverjetneje zaradi slabših socialnoekonomskih razmer, slabega dostopa do zdravnikov in zdravil ter zaradi velike podhranjenosti (slika 2) (Parashar in sod., 2003).

Prav tako se v zadnjih dveh desetletjih pojavnost rotavirusnih okužb ni bistveno zmanjšala (Parashar in sod., 2003). Celo nasprotno, število hospitalizacij zaradi rotavirusnih okužb se z leti povečuje (Parashar in sod., 2006). Tako kar 40 % hospitalizacij zaradi driske predstavljajo rotavirusne okužbe. Povečanje deleža hospitalizacij zaradi rotavirusnih okužb je verjetno posledica standardizacije metod za določanje rotavirusov ter izboljšanja diagnostičnih preiskav (Greenberg in Estes, 2009). Vzrok za povečanje hospitalizacij je lahko tudi zmanjšanje primerov hospitalizacij zaradi drisk, ki jih povzročajo bakterije in paraziti, zaradi uvedbe ukrepov za izboljšanje higienskih in sanitarnih standardov. Največkrat je namreč driska, ki jo povzročijo bakterijski ali parazitski patogeni posledica zaužitja okužene hrane ali vode, za razliko od rotavirusov, ki se največkrat širijo od osebe do osebe, zaradi česar izboljšanje higienskih standardov ne vpliva na zmanjšanje rotavirusnih okužb (Parashar in sod., 2006).

Oralna rehidracijska raztopina, ki nadomesti izgubo telesne tekočine in jo mnogi štejejo kot pomemben dejavnik pri zmanjšanju smrti zaradi drisk, je pogosto neuspešna pri otrocih s hudim bruhanjem, kar vpliva na povečanje števila hospitaliziranih otrok (Parashar in sod., 2006).

V nasprotju s protimikrobnimi terapijami, ki so učinkovite proti določenim bakterijskim in parazitskim patogenom, pri rotavirusnih okužbah specifičnega zdravljenja ni (Parashar in sod., 2006).

Za resnejšimi rotavirusnimi okužbami najpogosteje zbolijo otroci med 4. in 24. mesecem starosti, čeprav se to na svetovni ravni spreminja. V državah v razvoju za rotavirusnimi

okužbami najpogosteje zbolijo otroci med 6 in 9 mesecem starosti, medtem ko v razvitih državah med 9 in 15 mesecem starosti.

Pri starejših otrocih, ki so bili že izpostavljeni rotavirusom, poteka ponovna okužba v zelo blagi obliki. Bolezen se lahko pojavi tudi pri novorojenčkih, vendar zaradi zaščite z materinimi protitelesi poteka načeloma brez bolezenskih znakov (Chandran in sod., 2010). Prav tako lahko za rotavirusno okužbo zbolijo odrasli ljudje, vendar okužba običajno poteka brez kliničnih znakov. Največkrat se okužba pojavi pri starših obolelih otrok, kjer se lahko izrazi kot driska. Klinični znaki rotavirusnih okužb so pogosti pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom, pri starejših in potnikih, ki potujejo v države v razvoju (Parashar in sod., 1998).

Rotavirusne okužbe se v okoljih z zmernim podnebjem pojavljajo sezonsko, najpogosteje od pozne jeseni do zgodnje pomladi. Opazne so regionalne razlike, npr. v ZDA se rotavirusne okužbe začnejo pojavljati jeseni na jugozahodu, nato epidemija potuje preko celotne ZDA do severovzhoda, kjer se spomladi konča (Greenberg in Estes, 2009; O’Ryan, 2009). Tudi v Evropi se pojavlja sezonsko nihanje rotavirusnih okužb. Ugotovili so, da se v Evropi vrh rotavirusnih okužb v zadnjih letih nagiba iz zimskih v spomladanske mesece. Tako je bilo v obdobju 2005/2006 v povprečju največ rotavirusnih okužb v februarju, v obdobju 2006/2007 v aprilu in marca v obdobjih 2007/2008 ter 2008/2009 (Iturizza-Gómara in sod., 2009; Iturizza-Gómara in sod., 2010).

Dejavniki sezonske pojavnosti rotavirusnih okužb niso znani, ugotavljajo namreč da ni neke določene temperature ali relativne vlažnosti, ki bi vplivala na povečani prenos rotavirusov, mogoč vzrok pa so lahko relativne spremembe v podnebnih razmerah (Levy in sod., 2008).

V okoljih s tropskim podnebjem se okužbe večinoma pojavljajo preko vsega leta. Ena izmed možnih razlag za ta pojav je, da je v področjih s tropskim podnebjem manj podnebnih sprememb in le-te niso dovolj velike, da bi povzročile opazne učinke pri povečanju ali zmanjšanju rotavirusnih okužb, kot se to dogaja v okoljih z zmernim podnebjem. V zadnjem času pa ugotavljajo, da vseeno prihaja do nihanj v številu rotavirusnih okužb, saj se tudi v tropskih območjih v hladnejših in suhih mesecih število rotavirusnih okužb nekoliko poveča (Levy in sod., 2008).

### 2.7.1 Molekularna epidemiologija

Uvedba molekularnih tipizacijskih metod je izboljšala razumevanje raznolikosti rotavirusnih sevov in omogočila obsežne molekularne epidemiološke raziskave po vsem svetu, ki so vplivale in še vplivajo na razvoj učinkovitih cepiv proti rotavirusnim okužbam (Tcheremenskaia in sod., 2007).

S preučevanjem rotavirusov z molekularnimi metodami so pokazali, da so genetsko zelo raznoliki. Od do sedaj ugotovljenih 15 različnih genotipov G in 28 različnih genotipov P, so kar 11 genotipov P in 10 genotipov G opisali pri človeških rotavirusih. Prav tako so pri ljudeh dokazali več kot 40 G/P genotipskih sestavov. Vendar se večinoma pojavljajo le štirje genotipski sestavi in sicer G1P[8], G2[4], G3P[8] ter G4P[8], ki predstavljajo več kot 90 % vseh rotavirusnih sevov (Greenberg in Estes, 2009).

V zadnjih 10 - 15 letih se pogosto pojavlja tudi genotip G9, ki trenutno velja za peti najpomembnejši genotip tako v Evropi kot tudi drugod po svetu. Predvidevajo, da bi naj pri genotipu G9 prišlo do prenosa le-tega iz prašiča na človeka. Najprej se je pojavil v kombinaciji z genotipom P[6], nato pa ga je nadomestil genotip G9P[8], ki je nastal kot posledica prerazporeditve genomskih odsekov med človeškimi genotipi G1P[8], G4P[8] in živalskim genotipom G9P[6]. Genotip G9P[6] se je namreč pri človeku slabše razmnoževal kot genotip G9P[8] (Cook in sod., 2004).

V epidemiologiji rotavirusnih genotipov obstajajo tudi velike geografske in časovne raznolikosti. Več genotipov lahko namreč hkrati kroži v isti pokrajini, prav tako se lahko v različnih pokrajinah pojavljajo različni genotipi, celo znotraj ene države. Poleg tega lahko v isti pokrajini pojavnost genotipov niha iz leta v leto (O`Ryan, 2009).

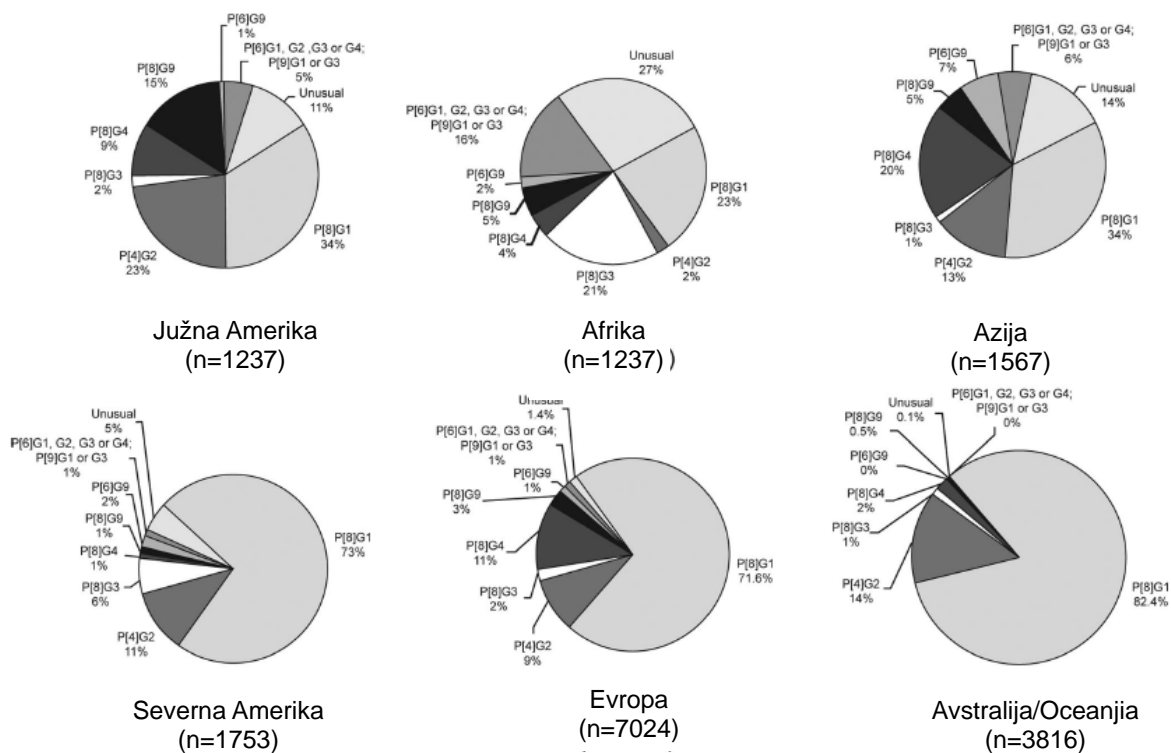
Vzrokov za tako veliko raznolikost rotavirusnih genotipov je več:

- kopičenje točkovnih mutacij, ki lahko privedejo do antigenske spremembe in nastanka novih sevov oziroma genotipov,
- prerazporeditve genomskih odsekov med različnimi obstoječimi človeškimi rotavirusnimi genotipi,

- prerazporeditve genomskih odsekov med obstoječimi živalskimi in človeškimi rotavirusnimi sevi in s tem prenos živalskih rotavirusnih sevov na ljudi ter
- neposreden prenos rotavirusnih sevov iz živali na ljudi (Desselberger in sod., 2006).

### 2.7.1.1 Porazdelitev rotavirusnih genotipov po svetu

Tudi na svetovni ravni so opazne precejšnje geografske razlike pri pojavljanju rotavirusnih genotipov (slika 3). Genotip G1[P8] predstavlja prevladujoči sev v Severni Ameriki, Avstraliji in Evropi, saj se pojavlja pri več kot 70 % vseh okužb, medtem ko v Južni Ameriki, Aziji in Afriki genotip G1P[8] predstavlja le okrog 30 % ali manj vseh rotavirusnih okužb. V Afriki se tudi zelo pogosto pojavlja genotip G3[P8] (21 %), ki so ga na ostalih kontinentih zaznali le v zelo majhnem odstotku (1 – 6 %).



Slika 3. Geografska raznolikost pojavljanja rotavirusnih genotipov po svetu (O'Ryan, 2009)



Nenavadni genotipi v splošnem predstavljajo le 4,9 % vseh rotavirusnih okužb. Najpogosteje se pojavljajo v Afriki, saj predstavljajo kar 27 % vseh rotavirusnih okužb, njihov delež pa ni zanemarljiv niti v Aziji (14 %) niti v Južni Ameriki (11 %). Medtem ko je njihov delež v Severni Ameriki (5 %), Evropi (1,4 %) in Avstraliji (0,1 %) zelo nizek. Relativno visoka pogostost pojavljanja nenavadnih genotipov v nekaterih delih sveta kaže, da so lahko ti genotipi genetsko stabilni in imajo možnost širjenja med prebivalstvom. Če se bodo ohranili v določeni populaciji v daljšem časovnem obdobju, je odvisno od njihove prilagoditve na receptorje črevesnih celic, kar bo razvidno iz nadaljnjega spremljanja pojavljanja teh genotipov (O`Ryan, 2009).

#### 2.7.1.2 Porazdelitev rotavirusnih genotipov v Evropi

V obdobju od leta 1994 do leta 2005 so se tudi v Evropi, tako kot v drugih predelih sveta z zmernim podnebjem, pojavljali predvsem rotavirusni genotipi G1P[8], G2P[4], G3P[8] in G4P[8], katerih porazdelitev se je od leta do leta zelo razlikovala (Desselberger in sod., 2006).

Leta 1995 se je v Evropi tudi prvič pojavil rotavirusni genotip G9P[6], ki ga je kasneje izpodrinil genotip G9P[8] (Iturizza-Gómara in sod., 2009). Odstotek mešanih okužb se je gibal med 1 in 26,4 %. Največ mešanih okužb so odkrili na Irskem in Danskem, najverjetneje zaradi izpopolnjenih in obsežnejših genotipizacijskih metod. Prav tako so leta 2000 poročali o visoki razširjenosti mešanih okužb v Albaniji, saj so predstavljale kar 42,8 % vseh okužb. V manjši meri so se v tem času pojavljali tudi drugi neobičajni rotavirusni genotipi (Desselberger in sod., 2006).

Molekularno epidemiologijo rotavirusov v Evropi spremljajo v evropski mreži EuroRotaNet (European Rotavirus Network) od januarja 2007. V projekt je poleg Slovenije vključenih še 15 držav: Belgija, Bolgarija, Danska, Finska, Francija, Nemčija, Grčija, Madžarska, Italija, Litva, Nizozemska, Romunija, Španija, Švedska in Velika Britanija. Eden izmed najpomembnejših ciljev projekta EuroRotaNet je spremljanje sprememb pri nastanku in širjenju rotavirusnih genotipov pred in po uveljavitvi

rotavirusnega cepiva v Evropi (Iturizza-Gómara in sod., 2009; Iturizza-Gómara in sod., 2010).

Z izsledki raziskav projekta EuroRotaNet ugotavljamo, da se je tudi v obdobju od leta 2005 do leta 2009 najpogosteje pojavljal genotip G1P[8] (48,43 %), sledili so genotipi G4P[8] (15,06 %), G9P[8] (11,56 %), G2P[4] (10,07 %) in G3P[8] (4,27 %). V obdobjih 2005/2006 in 2006/2007 je bil genotip G9P[8] drugi najpogosteje dokazani rotavirusni genotip med obolelimi otroci (Iturizza-Gómara in sod., 2009; Iturizza-Gómara in sod., 2010).

Pojavnost genotipa G2P[4] se je v rotavirusni sezoni 2006/2007 povečala, nato pa je v naslednjih obdobjih upadla. Genotip G3P[8] se je v vseh obdobjih pojavljal v približno enakem odstotku. Povečal pa se je delež genotipa G4P[8] in sicer iz 4,23 % v obdobju 2005/06 na 19,46 % v obdobju 2008/09 (Iturizza-Gómara in sod., 2009; Iturizza-Gómara in sod., 2010).

Zanimiv je tudi podatek, da so na Hrvaškem in v Albaniji, ki nista del projekta EuroRotaNet, v obdobju 2005/2006 ugotovili, da kombinacije genotipov G/P ne ustrezajo porazdelitvi genotipov v zmernih podnebjih, temveč je bila porazdelitev podobna kot v področjih s tropskim podnebjem. Najverjetneje zaradi preseljevanja ljudi iz Afrike, ki uporabljajo balkanska pristanišča kot vstop v Evropo (Tcheremenskaia in sod., 2007)

Večinoma, skoraj 90 % rotavirusnih sevov je bilo človeškega izvora, preostali delež pa so predstavljali prazporejeni živalski in človeški sevi (1,7 %), prazporejeni človeški sevi (1,1 %) in v manjši meri rotavirusni sevi živalskega izvora (0,3 %) (Iturizza-Gómara in sod., 2009; Iturizza-Gómara in sod., 2010).

Značilen je bil pojav mešanih rotavirusnih okužb, ki so predstavljale okrog 4 % vseh rotavirusnih okužb. Najpogosteje se je pojavljala kombinacija dveh ali več genotipov G z enim genotipom P (2,79 %). Največkrat so zasledili genotipski sestav G1+G9P[8], v manjši meri pa so se pojavile tudi kombinacije genotipa G z več genotipi P (0,77 %), kjer je prevladoval genotipski sestav G1P[4]+P[8]. Opisali so tudi kombinacije več genotipov

G z več genotipi P (0,66 %), kjer so najpogosteje dokazali genotipski sestav G1+G2P[4]+P[8] (Iturizza-Gómara in sod., 2009; Iturizza-Gómara in sod., 2010).

V zadnjih letih so se tudi v Evropi pojavili novi rotavirusni sevi, predvsem G12 in G8, vendar pojavnost okužbe s temi sevi, kljub vsakoletnemu povečanju, ostaja v nasprotju z drugimi razmeroma nizka (Iturizza-Gómara in sod., 2009; Iturizza-Gómara in sod., 2010).

### 2.7.1.3 Porazdelitev rotavirusnih genotipov v Sloveniji

V Sloveniji je v obdobju od leta 1988 do leta 1994 prevladoval genotip G4P[8] (45,2 %), kot drugi najpogostejši se je pojavljal G1P[8] (17,8 %), v manjši meri pa sta bila prisotna tudi genotipa G3P[8] in G3P[9] (Steyer, 2002).

V obdobju od leta 1994 do 2001 so na istem območju dokazali le genotip G1P[8].

V zimskem obdobju 2001/2002 so v Sloveniji prvič dokazali genotip G9 (Steyer in sod., 2005).

V obdobju 2005/2006 je bil ponovno najpogosteje dokazani genotip G1P[8] (63,2 %). Kot drugi najpogostejši se je pojavljal genotip G9P[8] (22,8 %), sledila sta mu genotipa G4P[8] (8,8 %) in G3P[8] (1,7 %). V tem obdobju niso dokazali genotipa G2P[4]. Prvič sta se pojavila tudi genotipa G8P[8] in G12P[8] (Steyer in sod., 2007).

V letu 2007 je bil najpogostejši genotip G1P[8] (56 %), sledila sta mu G4P[8] (16,5 %) in G2P[4] (15,3 %) ter G3P[8] (4,8 %) in G9P[8] (4 %). Prav tako so v istem letu zaznali relativno visok delež (2,5 %) rotavirusnih sevov, ki so najverjetneje živalskega izvora (G4P[6], G9P[9], G6P[11], G6P[9] in G10P[14]) (Steyer in sod., 2008).

## 2.8 ROTAVIRUSNA CEPIVA

Zaradi vse večjega števila obolelih otrok in smrti kot posledica okužb z rotavirusi, je potreba po razvoju cepiva postajala vedno večja (Glass in sod., 2006).

Raziskave za razvoj varnega in učinkovitega cepiva so se začele že v sredini 70. let prejšnjega stoletja (Dennehy, 2008). Na začetku je cepivo temeljilo na Jennerjevem pristopu, pri katerem so uporabljali žive oslABLJENE živalske rotavirusne seve (Dennehy, 2008; Ciarlet in Schödel, 2009; Greenberg in Estes 2009). Leta 1983 so prvič klinično testirali monovalentno živo oralno cepivo pridobljeno iz govejega rotavirusnega seva – cepivo RIT 4237 (Ciarlet in Schödel, 2009). Ugotovili so, da je cepivo učinkovito tako pri preprečevanju hudih drisk, kot tudi pri preprečevanju resnejših oblik okužb, nekoliko manj pa je bilo učinkovito pri preprečevanju blažjih oblik okužb. V državah v razvoju je bilo cepivo bistveno manj učinkovito, saj ni preprečevalo drisk, še manj pa hujših oblik bolezni. Zato je bil nadaljnji razvoj tega cepiva končan (Glass in sod., 2006; Greenberg in Estes, 2009).

RIT 4237 pa ni bilo edino razvito živo monovalentno živalsko cepivo. Razvili so namreč tudi cepivi WC3 (pridobljeno iz govejega rotavirusnega seva) in MMU18006 (pridobljeno iz opičjega rotavirusnega seva) (Dennehy, 2008; Ciarlet in Schödel, 2009).

V kliničnih testiranjih cepiva WC3 so pridobili različne rezultate glede učinkovitosti, saj je bilo cepivo WC3 prav tako kot cepivo RIT 4237 manj učinkovito v državah v razvoju kot v razvitih državah. Zato se cepivo WC3 niso več razvijali kot monovalentnega, ampak so ga uporabili kot izhodišče za razvoj bolj učinkovitega petvalentnega rotavirusnega cepiva RotaTeq® (Ciarlet in Schödel, 2009; Greenberg in Estes, 2009).

Cepivo MMU18006 so prvotno razvili kot monovalentno cepivo (Greenberg in Estes, 2009). Učinkovitost zaščite cepiva je bila pri različnih kliničnih testiranjih različna. Tako je bila npr. učinkovitost cepiva v Venezueli 90%, medtem ko v Združenih državah Amerike cepivo ni vzpodbudilo nobene zaščite (Ciarlet in Schödel, 2009). Zmanjšana učinkovitost je bila najverjetneje posledica razlik med vsebujočim serotipom (G3) MMU18006 in obstoječimi krožečimi človeškimi rotavirusnimi sevi v času testiranj (Greenberg in Estes, 2009). Poleg tega so v kliničnih študijah dokazali, da je posledica cepljenja pogosto povišana telesna temperatura (Ciarlet in Schödel, 2009; Greenberg in Estes, 2009).

Naslednjo generacijo cepiv so osnovali tako, da je vsebovala več rotavirusnih serotipov G. Tako se je pričel razvoj cepiv, ki so temeljila na preurejenih rotavirusnih sevih med živalskimi in človeškimi rotavirusnimi sevi (Dennehy, 2008).

Prvo večvalentno živo oralno cepivo je bilo RotaShield™, ki je vsebovalo 4 rotavirusne seve genotipov G1, G2, G3 in G4 (Dennehy, 2008). V kliničnih testiranjih cepiva so dokazali visoko učinkovitost proti rotavirusni okužbi, preprečilo je tudi hujši potek bolezni (Ciarlet in Schödel, 2009). Zaradi dokazane učinkovitosti, je FDA (Food and Drug Administration) v Združenih državah Amerike leta 1998 odobrila uporabo cepiva RotaShield™ (Glass in sod., 2006). Vendar so cepivo že po 9 mesecih umaknili iz tržišča, saj so kot posledico cepljenja večkrat navajali uvihanje črevesja. V državah v razvoju cepivo ni bilo klinično testirano, zaradi česar se je porajalo etično vprašanje o nadaljnji uporabi cepiva in sprejetja tveganja glede stranskih učinkov in s tem zmanjšanja števila smrti zaradi rotavirusov (Dennehy, 2008).

Na srečo so se raziskave za razvoj rotavirusnega cepiva nadaljevale tudi po nepričakovanih zapletih s cepivom RotaShield™ (Greenberg in Estes, 2009). Šele po 7 letih, leta 2006, sta na tržišču postali dostopni dve novi cepivi, Rotarix® (GlaxoSmithKline) in RotaTeq® (Merck Sharp&Dohme) (Ciarlet in Schödel, 2009).

RotaTeq je živo, oslABLJENO, oralno pentvalentno cepivo. Vsebuje 5 človeško – govejih prerazporejenih rotavirusnih sevov, pri čemer predstavlja osnovo goveji sev WC3, ki je kombiniran z najpogostejšimi antigeni človeških rotavirusov G1 - G4 in P[8]. Klinična testiranja so potekala pri več kot 70.000 otrocih in so bila večino opravljena v ZDA in drugih razvitih državah. Z rezultati obsežne raziskave so dokazali, da je cepivo RotaTeq zelo učinkovito prepreči okužbo, zmanjšalo se je tudi število hujših potekov bolezni ter število hospitaliziranih otrok. Najpomembnejše je bilo dejstvo, da se je cepivo izkazalo kot varno in ni povzročalo resnejših stranskih učinkov (npr. uvihanja črevesja). Z dojenjem se učinkovitosti cepiva ni zmanjšala, kljub temu, da je zaviralo nastanek protiteles kot imunski odgovor na cepljenje. Dokazali so, da RotaTeq ne interferira z imunskimi odzivi, ki jih povzročajo druga cepiva. V državah v razvoju klinične študije še potekajo (Ciarlet in Schödel, 2009).

Cepljenje s cepivom RotaTeq so v ZDA odobrili februarja 2006 (Dennehy, 2008). Junija 2006 so uporabo cepiva odobrili tudi v Evropski uniji (EMA, 2007). Do danes je cepivo odobreno že v več kot 90 –ih državah. Cepivo RotaTeq se daje v treh odmerkih. S prvim odmerkom cepijo dojenčke pri starosti med 6. in 12. tednom, z zadnjim odmerkom pa preden dosežejo starost 20 do 22 tednov, oz. najpozneje do 26. tedna starosti. Razmik med posameznimi odmerki mora biti vsaj 4 tedne (Glass in sod., 2006). Za zadostno zaščito zadostujeta že 2 odmerka. Cepivo je učinkovito tudi pri preprečevanju hujših oblik bolezni povzročenih s sevi G9, čeprav le-ti niso vključeni v cepivu (Greenberg in Estes, 2009).

Rotarix je živo, oslABLJENO oralno cepivo iz človeškega rotavirusnega seva z rotavirusnim genotipom G1P[8], ki predstavlja najpogostejše človeške rotavirusne antigene VP7 in VP4. V zgodnjih kliničnih preskušanjih glede učinkovitosti in varnosti cepiva so zajeli več kot 60.000 dojenčkov (Dennehy, 2008). Za razliko od zgodnjih preskušanj glede učinkovitosti cepiva RotaTeq, so le-ta potekala, ne le v razvitih državah (Finska), temveč tudi v državah v razvoju (Srednja in Južna Amerika). V testiranjih so dokazali, da je cepivo učinkovito tako proti blagim kot tudi proti hujšim oblikam rotavirusnega gastroenteritisa. Cepivo ni učinkovito samo proti okužbam s sevom G1, temveč tudi proti sevom G3, G4 in G9. V kasnejših raziskavah so tudi dokazali, da je cepivo učinkovito proti sevom G2P[4]. Čeprav zaradi različnega načina testiranja ni mogoče neposredno primerjati učinkovitosti cepiv RotaTeq in Rotarix, predvidevajo, da je cepivo Rotarix manj učinkovit proti G2 sevom. Pri nobenem od teh dveh cepiv niso ugotovili uvihavanja črevesja. Prednost cepiva Rotarix pred cepivom RotaTeq je v tem, da sta za ustrezno zaščito dojenčkov potrebna le dva odmerka, verjetno zaradi boljše prilagodljivosti na razmnoževanje v gastrointestinalnem traktu. Posledično je odmerek 100x manjši kot pri cepivu RotaTeq (Greenberg in Estes, 2009). Cepivo Rotarix so najprej odobrili v Mehiki in Dominikanski republiki in sicer leta 2004 (Dennehy, 2008). V državah Evropske unije je cepivo dobilo dovoljenje za promet leta 2006 (EMA, 2009).

V Sloveniji sta na voljo obe cepivi, tako RotaTeq kot Rotarix, vendar nista vključeni v obvezen program cepljenja otrok. V letu 2007 se je proti rotavirusnim okužbam cepilo okrog 1000 otrok, v letu 2008 pa že več kot 2300 (IVZ RS, 2010).

Zaradi možnih vprašanj glede varnosti uporabe cepiv RotaTeq in Rotarix, se trenutno razvija več tretjegeracijskih cepiv, ki temeljijo na uporabi mrtvih inaktiviranih virusih, na virusom podobnih delcih pripravljenih v bakulovirusih, na antigenih in na DNA cepivih. Poskusna testiranja teh cepiv na živalih sicer nakazujejo učinkovito zaščito, vendar še nobeno cepivo niso klinično testirali (Dennehy, 2008; Greenberg in Estes, 2009).

Pomemben vidik razvoja novih cepiv je denar, saj rotavirusno cepivo zaradi visoke cene ne bo nikoli popolnoma dostopno v najrevnejših državah sveta, kjer je smrtnost zaradi rotavirusnih okužb največja. Zato poskušajo v državah v razvoju razviti svoja cepiva, s čimer bi stroške cepiv znatno zmanjšali. Tako v Indiji že klinično preizkušajo cepivo iz rotavirusnega seva 116E (G9P[10]), ki kaže obetajoče rezultate glede varnosti in učinkovitosti (Greenberg in Estes, 2009).

Prav tako je v procesu testiranja tudi štirivalentno cepivo, ki vsebuje goveje prerazporejene rotavirusne seve osnovane na prvotnem govejem sevu iz Velike Britanije. Tudi pri tem cepivu so v predhodnih raziskavah dokazali dobro učinkovitost. Cepivo so sicer razvili v ZDA, vendar so zaradi olajšane in cenejše proizvodnje cepiv odobrili izdelavo cepiva farmacevtskim podjetjem v Braziliji, Kitajski in Indiji (Glass in sod., 2006).

V Avstraliji so razvili oralno rotavirusno cepivo s sevom RV3, ki se je v začetnih testiranjih sicer izkazalo kot varno, vendar ni povzročilo zadostnega imunskega odziva. V prihodnjih testiranjih bodo zato poskušali uporabiti večje odmerke cepiva (Glass in sod., 2006).

Čeprav so potrebne še številne raziskave glede učinkovitosti, stranskih učinkov in cenovne dostopnosti, razvoj novih cepiv zagotavlja pomemben aspekt za zmanjšanje obolevnosti in smrtnosti, ki sta povezani z rotavirusnimi okužbami (Glass in sod., 2006).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Klinični vzorci**

V raziskavo smo vključili 139 pozitivnih vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok do petega leta starosti, ki so zboleli za akutnim gastroenteritisom v obdobju od 3.1. do 14.10.2008 v ljubljanski regiji. V vseh vzorcih so predhodno dokazali rotaviruse z elektronsko mikroskopijo in/ali z encimsko imunsko metodo.

##### **3.1.2 Materiali za osamitev celokupne RNA s Trizolom**

- Trizol (Invitrogen, Carlsbad, ZDA)
- Kloroform (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 2 – propanol (Merck)
- 75 % etanol pripravljen iz absolutnega etanola (Merck)
- Demineralizirana in destilirana (ddH<sub>2</sub>O) sterilna voda brez ribonukleazne aktivnosti (Promega Corporation, Madison, ZDA)
- Epruvete Maxtract High Density (2.0 ml, Qiagen, Hilden, Nemčija)

##### **3.1.3 Reagenti za enostopenjsko RT-PCR**

- RNA
- ddH<sub>2</sub>O brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za VP7: VP7Fe in VP7Re, koncentracija 20μM (Iturriza Gómara in sod., 2001)
- začetni oligonukleotidi za pomnoževanje gena za VP4: VP4Fe in VP4Re, koncentracija 20μM (Gentsch in sod., 1992)
- 2x reakcijska mešanica (Invitrogen)
- MgSO<sub>4</sub>, koncentracija 5mM (Invitrogen)
- RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen)



### 3.1.4 Reagenti za vgnezdno PCR

- Pomnožki RT-PCR
- ddH<sub>2</sub>O brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- 5x PCR pufer (Invitrogen)
- Mešanica dNTP-jev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), koncentracija 10mM (Invitrogen)
- Začetni oligonukleotidi za določanje genotipa G: aBT1, aCT2e, G3e, aDT4, aAT8, G9e, G10, G12 in VP7Re, koncentracija 20μM (Gouvea in sod., 1990, Iturriza Gómara in sod., 2004)
- Začetni oligonukleotidi za določanje genotipa P: 2T-1, 3T-1, 1T-1D, 4T-1, 5T-1, P[11]e in VP4Fe, koncentracija 20μM (Gentsch in sod., 1992, Iturriza Gómara in sod., 2000)
- MgCl<sub>2</sub>, koncentracija 50mM (Invitrogen)
- *Tfi* DNA polimeraza, koncentracija 5U/μl (Invitrogen)

### 3.1.5 Materiali za agarozno gelsko elektroforezo

- Agaroz (Promega)
- 1x TAE pufrska raztopina
- Etidijev bromid, koncentracija 5mg/ml
- 6x nanašalni pufer (Invitrogen)
- Molekularni označevalec 100bp (Invitrogen)

### 3.1.6 Ostala laboratorijska oprema in aparature uporabljene pri delu

- Zaščitne rokavice brez smukca (Safeskin)
- 70 % etanol za razkuževanje površin
- Plastične epruvetke (Eppendorf)
- Stojala za epruvetke (Eppendorf)

- Mešalo vorteks (Tehtnica Železniki)
- Zaščitni komori (Iskra PIO, LFV 9)
- Staničevina
- Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415R)
- Ultracentrifuga (Beckman)
- Avtomatske pipete z območji pipetiranja 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 10-1000 µl (Eppendorf)
- Nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- Erlenmajerice
- Merilni valj
- Tehtnica
- Mikrovalovna pečica
- Termopomnoževalka (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400; Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700)
- Banjica za elektroforezo (BIO-RAD, Hercules, ZDA)
- Napajalnik za elektroforezo (LKB Bromma, East Lyme, ZDA)
- Aparatura za dokumentiranje gelov

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Osamitev celokupne RNA s Trizolom

Vzorci, iz katerih smo osamili celokupno RNA, smo predhodno redčili v sterilnem 0,1 M fosfatnem pufru (PBS) in jih shranili v pri -20 °C. Vzorce smo najprej odtajali in jih premešali na mešalu. Hkrati smo v brezprašni komori za vsak vzorec posebej pripravili 1,5 ml sterilne epruvetke ter 2,0 ml sterilne epruvetke z gelom (Maxtract High Density), ki smo jih označili z zaporedno številko vzorca kot na protokolnem listu. Vse epruvetke smo prenesli iz komore. Epruvetke z gelom smo na kratko centrifugirali pri 12300 obratih na minuto (14000x g). V 1,5 ml epruvetke pa smo odpipetirali 250 µl vzorca. K 250 µl vzorca smo nato v komori dodali 750 µl reagenta Trizol, premešali s pipetiranjem in inkubirali 5

minut pri sobni temperaturi. S tem smo dosegli razgradnjo celic oz. raztapljanje celičnih komponent in sproščanje virusne RNA iz virusne kapside, a hkrati ohranili integriteto RNA. Nato smo dodali 200 µl kloroforma in dobro premešali na mešalu. Vso vsebino smo prenesli v pripravljene epruvetke z gelom. Pri sobni temperaturi smo inkubirali 5 minut in s tem dosegli, da se je vodna faza jasno ločila od organske faze. Epruvetke z vsebino smo prenesli iz komore in jih dodatno centrifugirali 5 minut pri 12300 obratih na minuto (14000x g). Med centrifugiranjem smo v komori pripravili nov set 1,5 ml epruvetk za vsak vzorec in jih ustrezno označili. Nato smo zgornjo vodno fazo, ki vsebuje RNA, pazljivo prenesli v pripravljene epruvetke, dodali 500 µl 2-propanola, dobro premešali, inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi in centrifugirali 10 minut pri 16000x g. Supernatant smo odlili v odlagalnik v komori, obarjeno RNA sprali s 500 µl 75 % etanola, premešali na mešalu in 5 minut centrifugirali. Med centrifugiranjem smo v komoro položili staničevino, supernatant odlili v odlagalnik in na staničevini popivnali ostanek etanola z roba epruvetke. Odrpte epruvetke smo, položene navzdol na staničevino, sušili pri maksimalnem pretoku zraka, okrog 30 minut. Posušeno RNA smo raztopili v 40 µl sterilne ddH<sub>2</sub>O, proste nukleaz. Vzorce smo shranili v škatle v zamrzovalnik pri temperaturi –80°C.

### **3.2.2 Enostopenjska RT- PCR**

Z enostopenjsko RT-PCR smo rotavirusno RNA prepisali v cDNA in DNA nato pomnožili. V ločenih reakcijah pomnožene odseke genov za VP7 in VP4 smo uporabili za nadaljnje določanje genotipov G in P v reakciji vgnezdene PCR. Za enostopenjsko RT – PCR smo uporabljali komercialni komplet SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum (Invitrogen).

Ker je bil naš cilj pomnožitev odsekov genov za VP7 in VP4, smo RT-PCR izvajali v ločenih reakcijah z različnimi začetnimi oligonukleotidi. Tako smo za pomnoževanje gena G izbrali začetne oligonukleotide VP7 Fe (zač. oligonukleotid 1) in VP7 Re (zač. oligonukleotid 2), za pomnoževanje gena P pa začetne oligonukleotide VP4 Fe (zač. oligonukleotid 1) in VP4 Re (zač. oligonukleotid 2) (preglednica 1).

**Preglednica 1.** Osnovne lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov pri RT - PCR (Ituriza Gómara in sod., 2004; Gentsch in sod., 1992)

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'	Mesto prileganja
VP7Fe	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC	51 -71
VP7Re	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC	914 - 932
VP4Fe	TAT GCT CCA GTN AAT TGG	132 -149
VP4Re	ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG	775 - 795

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec z že določenim genotipom, za negativno kontrolo pa ddH<sub>2</sub>O.

Najprej smo v 0,2 ml epruvetke odpipetirali po 2µl H<sub>2</sub>O, 1 µl začetnega oligonukleotida 1 ter 2 µl RNA.

Nato smo epruvetke prenesli v termopomnoževalnik, kjer smo RNA denaturirali 5 minut pri 97 °C. Medtem smo pripravili reakcijsko mešanico, ki je za posamezen vzorec vsebovala 9 µl ddH<sub>2</sub>O, 25 µl 2x reakcijske mešanice, 1 µl začetnega oligonukleotida 2, 8 µl MgSO<sub>4</sub> (5mM) in 1 µl RT/Platinum Taq Mix. Končni volumen celotne mešanice je tako znašal 50 µl. Količine dodanih reagentov smo morali predhodno še izračunati na podlagi podatkov prikazanih v preglednici 2.

**Preglednica 2.** Začetne in končne koncentracije reagentov za RT –PCR.

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
2x reakcijski miks	2x	1x
začetni oligonukleotid 1 (za gen G ali P)	20 µM	0,4 µM
začetni oligonukleotid 2 (za gen G ali P)	20 µM	0,4 µM
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	5 mM
RT/Platinum Taq Mix	5 U/µl	1U/µl

Ko je bila RNA denaturirana, smo epruvetke vzeli iz termopomnoževalnika ter v vsako odpipetirali po 44 µl reakcijske mešanice. Nato smo jih znova vstavili v termopomnoževalnik, zagnali program (preglednica 3) ter tako pomnožili 881 bp dolg odsek gena G in 663 bp dolg odsek gena P.

**Preglednica 3.** Temperaturni in časovni potek RT – PCR

Proces	Temperatura (°C) za gen G	Temperatura (°C) za gen P	Čas (min)	Število ciklov
Začetno razdvajanje	94	94	2	1
Razdvajanje	94	94	0,25	40
Vezava začetnih oligonukleotidov	52	50	0,5	
Podaljševanje	72	72	1	
Končno podaljševanje	72	72	5	1

**3.2.3 Vgnezdena PCR**

Z reakcijo vgnezdene PCR smo določili genotipe G in genotipe P in sicer z uporabo tipsko specifičnih notranjih začetnih oligonukleotidov, ki prilegajo na variabilna mesta znotraj pomnoženega gena G oziroma gena P. Ker se ta mesta med genotipi razlikujejo, nam je ta reakcija omogočila, da smo lahko, potem ko smo odčitali velikost pomnoženega odseka, določili genotip vzorca.

Za določanje genotipov G smo uporabili mešanico začetnih oligonukleotidov aBT1, aCT2e, G3e, aDT4, aAT8, G9e, G10, G12 ter začetni oligonukleotid 2 - VP7Re (preglednica 4). Za določanje genotipov P pa smo uporabili začetni oligonukleotid 1 - VP4Fe in mešanico začetnih oligonukleotidov 2T-1, 3T-1, 1T-1D, 4T-1, 5T-1 ter P[11]e (preglednica 5).

**Preglednica 4.** Osnovne lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov za določanje genotipov G pri vgnezdenu PCR (Gouvea in sod., 1990, Iturriza Gómara in sod., 2004)

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5' - 3'	Mesto prileganja	Velikost pomnoženega odseka [bp]	Določanje genotipa
aBT1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	314-335	618	G1
aCT2e	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	411-435	512	G2
G3e	ACG AAC TCA ACA CGA GAG G	250-269	682	G3
aDT4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	480-499	452	G4
aAT8	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	178-198	754	G8
G9e	CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC	757-776	179	G9
G10	ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG	666-687	266	G10
G12	CCG ATG GACGTAACGTTGTA	548-567	387	G12

**Preglednica 5.** Osnovne lastnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov za določanje genotipov P pri vgnezdni PCR (Gentsch in sod., 1992, Iturriza Gómara in sod., 2000)

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporednje 5' - 3'	Mesto prileganja	Velikost pomnoženega odseka [bp]	Določanje genotipa
2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	474-494	483	P[4]
3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259-278	267	P[6]
1T-1D	TCT ACT GGR TTR ACN TGC	339-356	345	P[8]
4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	385-402	391	P[9]
5T-1	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	575-594	583	P[10]
P[11]e	GTA AAC ATC CAG AAT GTG	305-323	312	P[11]e

Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico, katere končni volumen je znašal 50  $\mu$ l. Količine dodanih reagentov smo izračunali iz podatkov podanih v preglednici 6 in v preglednici 7.

V reakcijsko mešanico za določanje genotipov G smo za posamezen vzorec dodali 26  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l 5 x PCR pufra, 1  $\mu$ l mešanice dNTP, 8  $\mu$ l mešanice začetnih oligonukleotidov 1, 1  $\mu$ l začetnega nukleotida VP7Re, 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l Tfi polimeraze DNA ter 1  $\mu$ l DNA.

**Preglednica 6.** Začetne in končne koncentracije reagentov za določanje genotipov G pri vgnezdni PCR.

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
5x PCR pufer	5x	1x
Mešanica dNTP	10 mM	0,2 mM
Mešanica začetnih oligonukleotidov za določanje genotipov G	20 $\mu$ M	0,32 $\mu$ M oz. 0,4 $\mu$ M vsakega
Začetni oligonukleotid 2	20 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	10 mM
Tfi polimeraza DNA	5 U/ $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l

V reakcijsko mešanico za določanje genotipov P pa smo za vsak vzorec dodali 27  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l 5 x PCR pufra, 1  $\mu$ l mešanice dNTP, 6  $\mu$ l začetnega oligonukleotida VP4Fe, 1  $\mu$ l mešanice začetnih oligonukleotidov 2, 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l Tfi DNA polimeraze ter 2  $\mu$ l DNA.

**Preglednica 7.** Začetne in končne koncentracije reagentov za določanje genotipov P pri vgnezdni PCR.

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
5x PCR pufer	5x	1x
Mešanica dNTP	10 mM	0,2 mM
Začetni oligonukleotid 1	20 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M
Mešanica začetnih oligonukleotidov za določanje genotipov P	20 $\mu$ M	0,24 $\mu$ M oz. 0,4 $\mu$ M vsakega
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	10 mM
Tifi DNA polimeraza	5 U/ $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l

Epruvetke s pripravljenimi reakcijskimi mešanicami smo nato vstavili v termopomnoževalnik in izbrali ustrezen program za določitev genotipov G oz. genotipov P (preglednica 8).

**Preglednica 8:** Temperaturni in časovni potek vgnezdene PCR

Proces	Temperatura (°C) za genotipe G	Temperatura (°C) za genotipe P	Čas (min)	Število ciklov
Začetno razdvajanje	94	94	4	1
Razdvajanje	94	94	0,5	35
Vezava začetnih oligonukleotidov	42	45	1	
Podaljševanje	72	72	1	
Končno podaljševanje	72	72	10	1

### 3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Najprej smo pripravili 2 % agarozni gel. V erlenmajerico smo odtehtali 1g agaroze in 75ml 1x pufra TAE ter pokrito segrevali v mikrovalovki tako dolgo, da se je agarozna raztopila. Nato smo jo ohladili na približno 60 °C, dodali 7,5  $\mu$ l etidijevega bromida ter jo zlili v nosilec z nameščenim glavničkom in počakali, da se je gel strdil. Strjen gel smo skupaj z nosilcem prenesli v banjico z 1x pufrom TAE in pazljivo odstranili glavniček.

Na mikrotitrski ploščici smo v vsaki luknjici pripravili mešanico iz 2  $\mu$ l 6x nanašalnega pufra ter 10  $\mu$ l vzorca pomnoženih odsekov. Mešanico smo nato nanесли v vdolbinice na

gelu. Poleg vzorcev smo na gel nanegli še pozitivno in negativno kontrolo ter 5  $\mu$ l molekularnega označevalca.

Elektroforeza je potekala 50 minut pri napetosti 90 V.

Po končani elektroforezi, smo nosilec z gelom previdno odstranili iz banjice in ga prenesli v aparaturo za dokumentiranje gelov. Tako smo s pomočjo računalniškega programa dobili podatke iz katerih so bile razvidne dolžine PCR pomnožkov za posamezen vzorec. Le – te smo primerjali z dolžino molekularnega označevalca in tako natančno določili genotip v vzorcu.

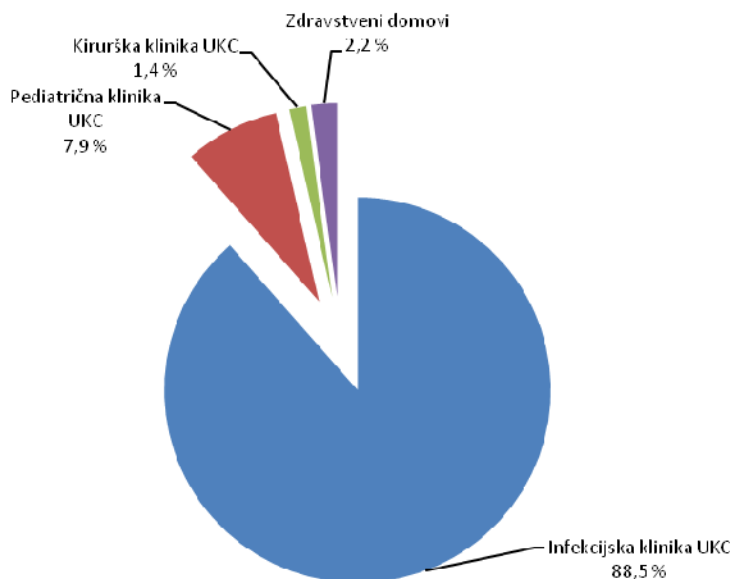


## 4 REZULTATI

### 4.1 ZNAČILNOST VZORCEV IZ TREBKOV OTROK, OBOLELIH ZA ROTAVIRUSNIM GASTROENTERITISOM

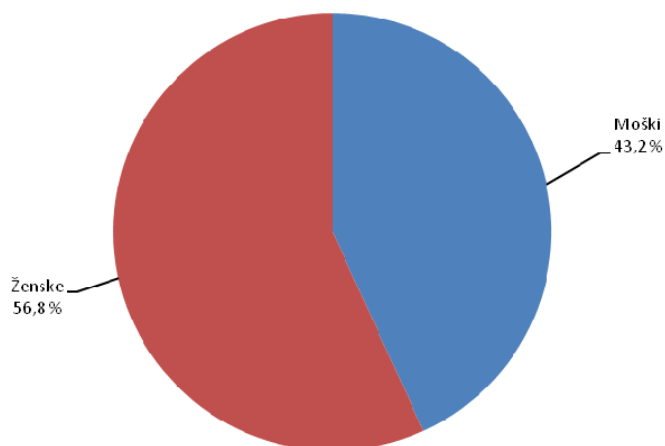
Genotipizirali smo 139 vzorcev iztrebkov otrok do 5. leta starosti, ki so oboleli za rotavirusnim gastroenteritisom. Vzorci so bili odvzeti v obdobju od 3.1. do 14.10.2008 v ljubljanski regiji. Predhodno so rotaviruse v vzorcih potrdili z elektronsko mikroskopijo in z encimskoimunsko metodo.

Večino vzorcev smo pridobili iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC Ljubljana, kar 88,5 % ter manjši delež iz Pediatrične klinike UKC Ljubljana in Kirurške klinike UKC Ljubljana ter iz Zdravstvenih domov v Ljubljani (slika 4).



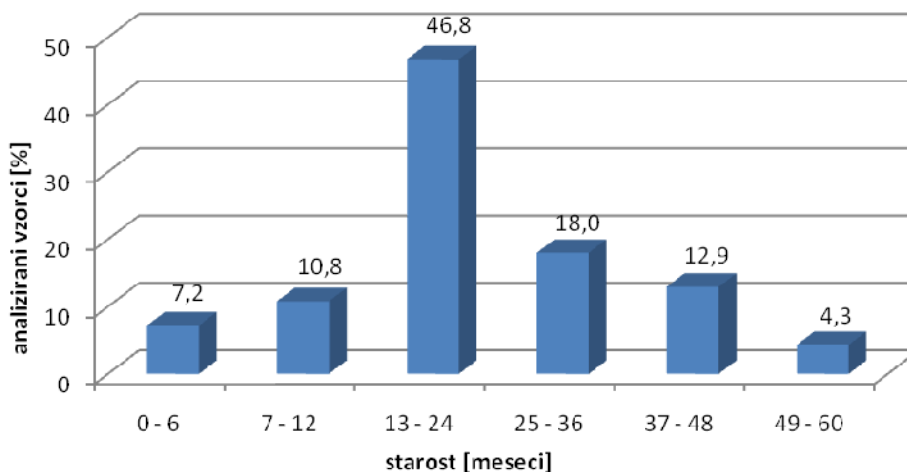
**Slika 4.** Delež analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, glede na pošiljateljce v ljubljanski regiji v letu 2008

Porazdelitev obolelih otrok glede na spol je bila nekoliko v prid deklicam. Od vseh vzorcev, vključenih v raziskavo, je bilo 57 % od obolelih deklic in 43 % od obolelih dečkov (slika 5).



**Slika 5.** Delež analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, glede na spol v ljubljanski regiji v letu 2008

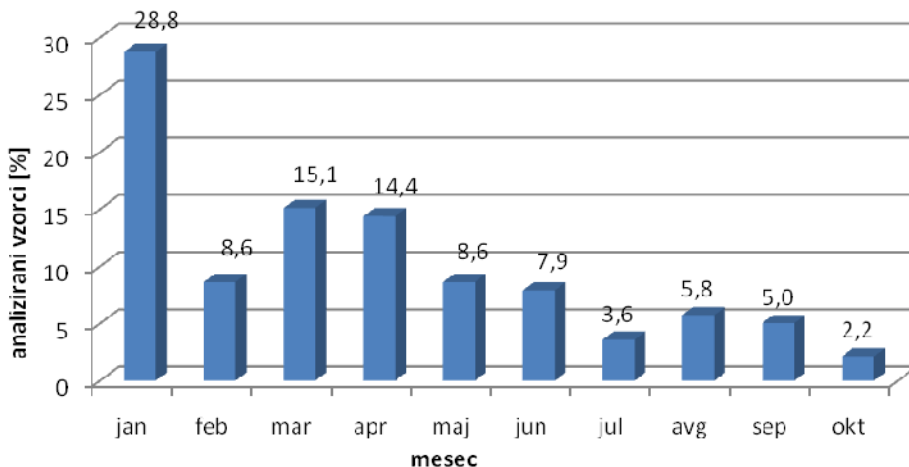
Kot je razvidno iz slike 6 je bila skoraj polovica obolelih otrok v starostni skupini od 13-24 mesecev (46,8 %), sledi skupina otrok starih od 25-36 mesecev, nato otroci iz starostne skupine 37-48 mesecev ter otroci iz starostne skupine 7-12 mesecev. Delež vzorcev od otrok do 6. meseca starosti je majhen in znaša le 7,2 %. Najmanjši delež vzorcev smo prejeli od obolelih otrok, starih med 49 in 60 mesecev.



**Slika 6.** Starostna porazdelitev otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008

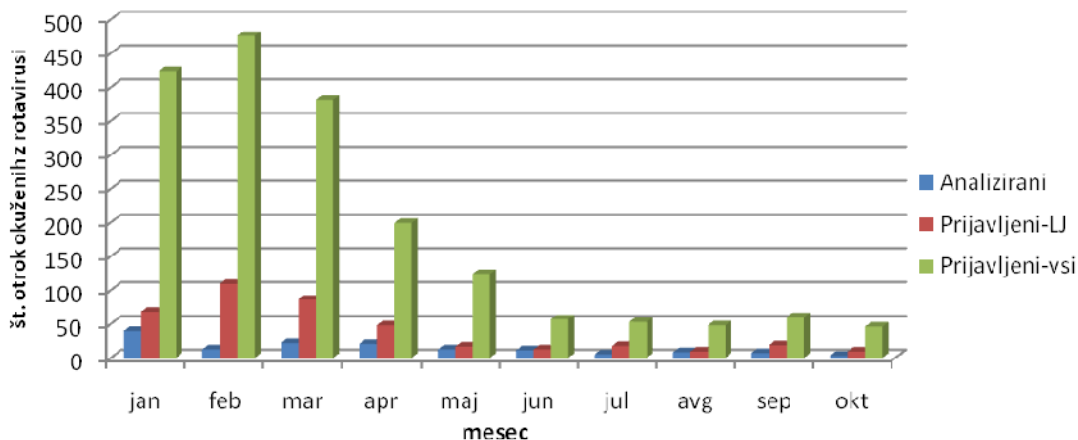
Kar tretjino vseh vzorcev, ki smo jih vključili v raziskavo so poslali januarja 2008, sledil je upad v februarju in nato spet povečanje v spomladanskih mesecih (marec, april). Vzorci,

poslani v poletnih mesecih so bili približno enakomerno razporejeni, najmanj prejetih vzorcev je bilo oktobra (slika 7).

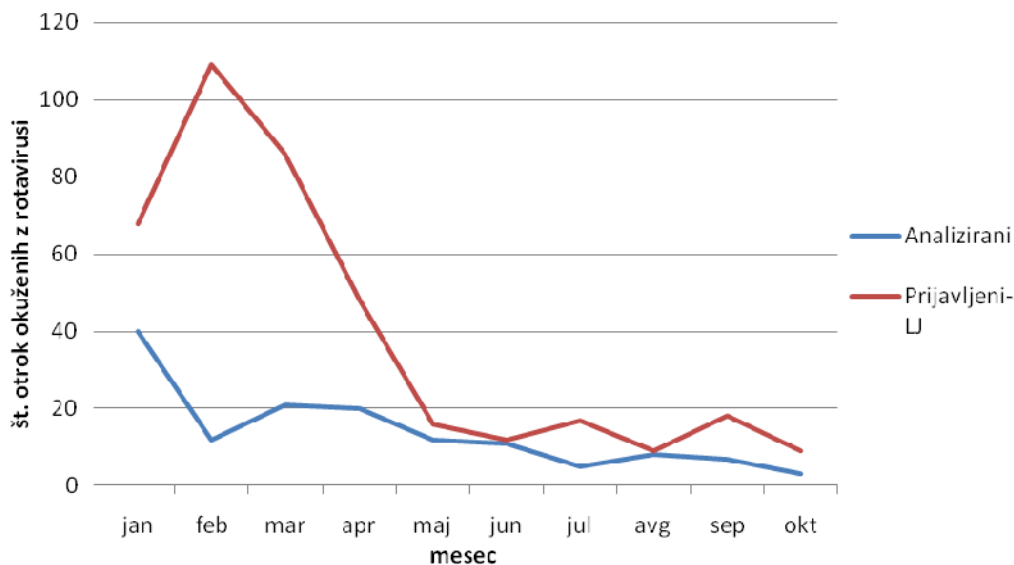


**Slika 7.** Porazdelitev analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, po mesecih v ljubljanski regiji v letu 2008

Po podatkih IVZ je bilo leta 2008 največ prijavljenih primerov rotavirusnih okužb v mesecu februarju. Večina prijavljenih primerov rotavirusnih okužb je bila v obdobju od januarja do marca, od meseca aprila naprej pa se je število prijavljenih primerov zmanjševalo. Najmanj prijavljenih primerov je bilo v mesecu avgustu in oktobru (slika 8 in slika 9).



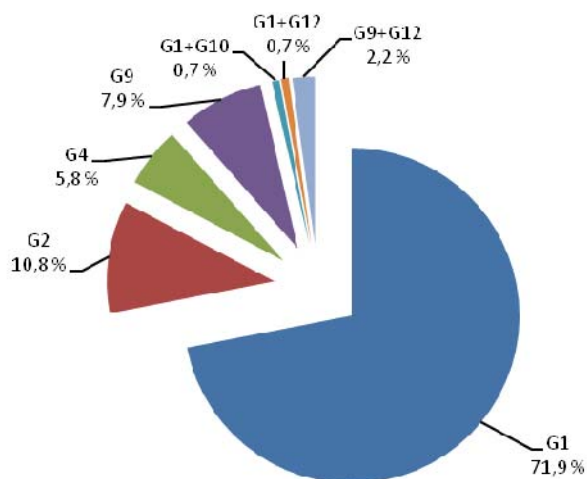
**Slika 8.** Primerjava števila analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008 s številom prijavljenih rotavirusnih okužb v ljubljanski regiji v letu 2008 in s številom prijavljenih rotavirusnih okužb v celotni Sloveniji v letu 2008 (IVZ RS, 2008)



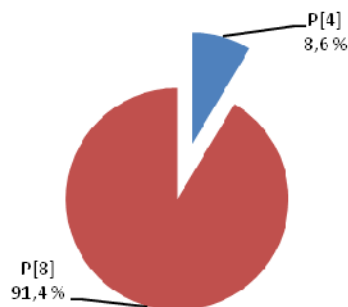
**Slika 9.** Primerjava števila analiziranih vzorcev iztrebkov otrok, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008 s številom prijavljenih primerov rotavirusnih okužb v ljubljanski regiji v letu 2008 (IVZ RS, 2008)

#### 4.2 PORAZDELITEV ROTAVIRUSNIH GENOTIPOV G IN P

Iz slik 10 in 11 je razvidno, da smo pri preiskovanih vzorcih dokazali 7 različnih rotavirusnih genotipov G in le 2 različna rotavirusna genotipa P. Najpogosteje se je pojavljal rotavirusni genotip G1 (72 %), v manjši meri pa smo zasledili tudi rotavirusne genotipe G2, G9 in G4. V 5 vzorcih pa smo dokazali tudi mešane rotavirusne genotipe in sicer: G1+G10, G1+G12 in G9+G12, ki so bili v sestavi z rotavirusnim genotipom P[8]. Prav tako se je pri večini vzorcev pojavljal rotavirusni genotip P[8], kar v 91 %, pri ostalih vzorcih pa smo dokazali rotavirusni genotip P[4].

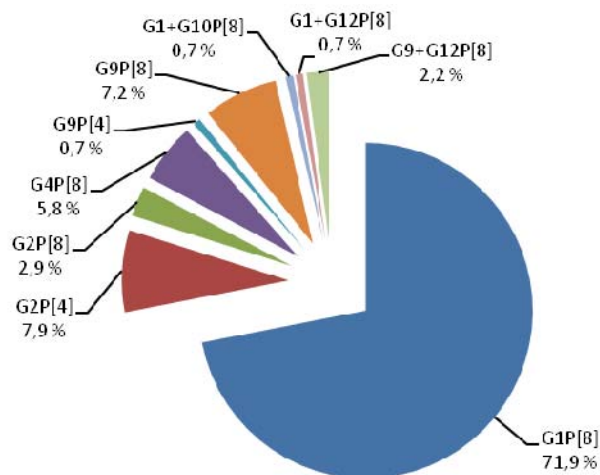


**Slika 10.** Pogostost pojavljanja rotavirusnih genotipov G pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008



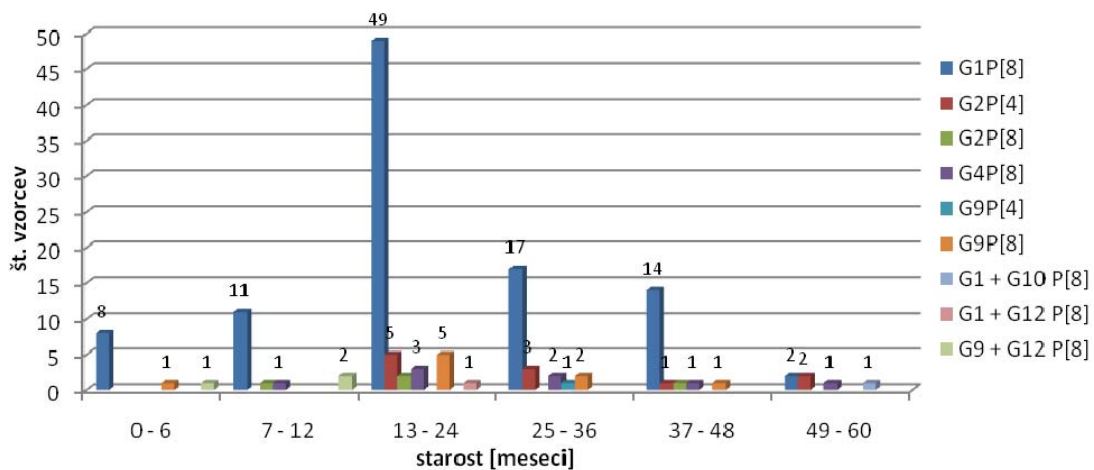
**Slika 11.** Pogostost pojavljanja rotavirusnih genotipov P pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008

Prevladujoči rotavirusni genotip je bil pričakovano G1P[8]. Dokazali smo ga v kar 71,9 % vzorcev. Sledila sta mu rotavirusna genotipa G2P[4] z 7,9 % in G9P[8] z 7,2 %. Rotavirusni genotip G4P[8] smo določili v 6 %, G2P[8] v 3 %, najredkeje pa smo dokazali rotavirusni genotip G9P[4]. Pri 3,6 % obolelih smo dokazali mešane rotavirusne okužbe (slika 12).



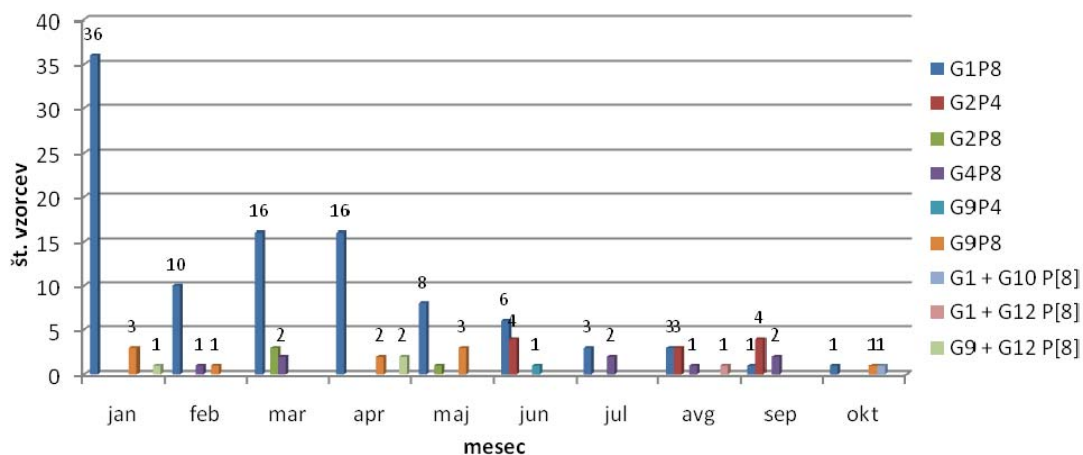
**Slika 12.** Porazdelitev rotavirusnih genotipov pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, v ljubljanski regiji v letu 2008

Na sliki 13 je prikazana porazdelitev rotavirusnih genotipov pri otrocih obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom po starostnih skupinah v ljubljanski regiji v letu 2008. Opazimo lahko, da je pri večini starostnih skupinah prevladujoč rotavirusni genotip G1P[8], razen v starostni skupini 49–60 mesecev, kjer sta rotavirusna genotipa G1P[8] in G2P[4] zastopana z enakim številom vzorcev. Rotavirusnega genotipa G2P[4] nismo dokazali niti v starostni skupini do 6 mesecev, niti v starostni skupini od 7-12 mesecev. V ostalih starostnih skupinah se pojavlja kot drugi oz. tretji najpogostejši genotip. Iz grafa lahko razberemo tudi, da se vseh šest rotavirusnih genotipov ne pojavi v nobeni starostni skupini. Pri starosti do 6 mesecev se pojavljajo le 3 genotipi, v starostni skupini od 7-12 mesecev in od 49-60 mesecev pa 4 genotipi. Največja raznolikost rotavirusnih genotipov je pri obolelih otrocih starih med 13 in 24 mesecev (6 različnih rotavirusnih genotipov). Pri ostalih starostnih skupinah smo dokazali po 5 različnih rotavirusnih genotipov. Najredkeje se je pojavljal rotavirusni genotip G9P[4], ki smo ga dokazali le v starostni skupini od 25-36 mesecev.



**Slika 13.** Porazdelitev rotavirusnih genotipov pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, po starostnih skupinah v ljubljanski regiji v letu 2008

Na sliki 14 je prikazana pogostost pojavljanja rotavirusnih genotipov pri otrocih obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom glede na mesec v letu 2008. V skorajda vseh mesecih smo največkrat dokazali rotavirusni genotip G1P[8], razen avgusta in septembra, ko je njegov delež nižji. Septembra je prevladoval rotavirusni genotip G2P[4]. V večjem številu vzorcev pa smo ga dokazali tudi v juniju in v avgustu. Januarja so se, kljub največjemu številu analiziranih vzorcev, pojavili le trije rotavirusni genotipi (G1P[8], G9P[8] in G9+G12[8]). Rotavirusni genotip G9P[4] smo dokazali le v mesecu juniju v enem vzorcu. Rotavirusni genotip G2P[8] pa smo zaznali le v marcu in v maju.



**Slika 14.** Porazdelitev rotavirusnih genotipov pri otrocih, obolelih za rotavirusnim gastroenteritisom, po mesecih v ljubljanski regiji v letu 2008

## 5 RAZPRAVA

Rotavirusi kot najpogostejši povzročitelji akutnega gastroenteritisa pri otrocih, predstavljajo velik problem tako v državah v razvoju kot tudi v razvitih državah. Ocenjujejo namreč, da bi naj v letu 2008 zaradi rotavirusnih okužb umrlo več kot 380.000 otrok, večina v državah v razvoju (Chandran in sod., 2010). Za rotaviruse je značilna tudi velika genotipska raznolikost, kar predstavlja veliko oviro pri razvoju učinkovitih cepiv (Desselberger in sod., 2006). Prav zaradi velike raznolikosti in zmožnosti genomskih prerazporejanj rotavirusov, bi morala cepiva nuditi dobro heterotipsko zaščito z visoko učinkovitostjo. Za ugotavljanje učinkovitosti cepiv je torej nujno spremljanje razširjenosti in možnih sprememb rotavirusnih genotipov pred in po uvedbi cepiv. Težavo predstavljajo predvsem novi genotipi (G8, G9, G10 in G12), ki se vse bolj razširjajo. Zato bi bilo v prihodnje pri oblikovanju novih cepiv smotrno upoštevati tudi trenutno stanje genotipskega profila rotavirusov (Tcheremenskaia in sod., 2007).

Naša raziskava je del evropskega projekta EuroRotaNet, ki spremlja pojavljanje rotavirusnih genotipov pred in po uvajanju cepljenja. V raziskavi smo tako ugotavljali kakršnekoli spremembe pri rotavirusnih genotipih v ljubljanski regiji v letu 2008.

### 5.1 ZNAČILNOST VZORCEV IZ TREBKOV OTROK, OBOLELIH ZA ROTAVIRUSNIM GASTROENTERITISOM

Od 139 analiziranih vzorcev jih je bilo kar 123 poslanih iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC Ljubljana, kar je bilo tudi pričakovano, saj večino otrok s sumom na rotavirusno okužbo in hujšo klinično sliko napotijo na to kliniko. Nekaj vzorcev smo pridobili tudi iz Pediatrične in Kirurške klinike UKC Ljubljana. Delež vzorcev, ki smo jih pridobili iz teh klinik, je bil veliko manjši, kajti bolnike na teh klinikah sprejmejo zaradi kakšne druge osnovne bolezni ali stanja in se šele naknadno okužijo z rotavirusi. Iz zdravstvenih domov smo pridobili le 3 vzorce, kar je bilo premalo, da bi lahko primerjali pojavnost genotipov med bolnišnicami in zdravstvenimi domovi. Z raziskavami v sklopu



projekta EuroRotaNet so prišli do zaključka, da pri porazdelitvi pojavljanja rotavirusnih genotipov med bolnišničnim in domačim okoljem ni bistvene razlike. Izjema je bil le rotavirusni genotip G2P[4], ki se je pogosteje pojavljal pri hospitaliziranih otrocih, kar je bilo morda povezano z vedno številčnejšim pojavljanjem tega genotipa med obolelimi, najverjetneje zaradi mutacije imenovane »pobeg protitelesom«. Ob pomanjkanju navzkrižne zaščite poteka okužba s hudimi kliničnimi znaki in simptomi, zato je največkrat potrebna hospitalizacija obolelih (Iturriza-Gómara in sod., 2010).

Analizirane vzorce so v 57 % odvzeli obolelim deklicam, preostali delež so predstavljali vzorci obolelih dečkov. Morda bi pričakovali, da bi bilo več obolelih moškega spola, kajti po podatkih Statističnega urada Republike Slovenije se letno rodi več dečkov kot deklic. Tudi tukaj nismo naredili primerjave pojavljanja rotavirusnih genotipov med spoloma, saj smo sklepali, da tako kot drugod v Evropi tudi v Sloveniji ne bi bilo bistvenih razlik (Iturriza-Gómara in sod., 2009; Iturriza-Gómara in sod., 2010).

Pri analizi starostne porazdelitve obolelih otrok smo potrdili našo začetno hipotezo, da bo največ obolelih otrok med prvim in drugim letom starosti. Najmanj obolelih otrok je bilo med 4. in 5. letom starosti, verjetno zaradi navzkrižne zaščite, ki so jo pridobili ob večkratnem stiku z rotavirusi. Do 6. meseca starosti je obolelo 10 otrok. Odstotek obolelih bi morda v tej starostni skupini lahko bil nekoliko nižji, kajti novorojenčki so do 3. meseca starosti ponavadi zaščiteni z maternimi protitelesi, prav tako bi naj imelo zaščitno vlogo tudi materino mleko (Asensi in sod., 2006). Iz tega lahko sklepamo, da materina protitelesa niso nudila otroku zadostno zaščito proti rotavirusom, mogoče otrok ni bil dojen ali pa se je okužil otrok z imunsko pomanjkljivostjo. Možen vzrok pa so tudi bolnišnično pridobljene okužbe. V eni izmed raziskav v ZDA so namreč poročali, da več kot 20 % bolnikov sprejetih v bolnišnice zaradi primarne bolezni zbolijo za rotavirusno okužbo (Greenberg in Estes, 2009).

Kot je razvidno iz slik 7, 8 in 9 je največ obolelih za rotavirusnimi okužbami v poznih zimskih in v zgodnjih spomladanskih mesecih. Število prijavljenih primerov rotavirusnih okužb v ljubljanski regiji sovpada s pojavljanjem rotavirusnih okužb drugod po Sloveniji. Število analiziranih vzorcev pa ne sovpada popolnoma s številom prijavljenih primerov

rotavirusnih okužb v ljubljanski regiji v letu 2008. Največ analiziranih vzorcev je bilo namreč v januarju, medtem ko je bilo največ prijavljenih primerov v mesecu februarju. V mesecu februarju je bil presenetljivo nizek delež analiziranih vzorcev (9 %). Do razlik je najverjetneje prišlo zaradi tega, ker na IVZ beležijo vse prijave rotavirusnih okužb v ljubljanski regiji, tako iz bolnišnic kot iz zdravstvenih domov, pri naši raziskavi pa smo analizirali predvsem vzorce, ki so bili poslani iz UKC Ljubljana. Iz obeh slik pa je razvidno upadanje števila obolelih po mesecu aprilu.

Tako kot drugod v Evropi je tudi v Sloveniji viden vzorec sezonskega pojavljanja rotavirusnih okužb z vrhovi v zimskih in spomladanskih mesecih (slika 9), kar je značilno za področja v zmernem klimatskem pasu (Gray in sod., 2008). Po podatkih IVZ RS je bil takšen pojav rotavirusnih okužb značilen tudi za prejšnja leta (IVZ RS, 2010), razen v letu 2007, ko je bilo presenetljivo največ obolelih v aprilu in maju. Predvidevali so, da bi bile lahko vzrok za takšno pojavnost rotavirusnih okužb podnebne spremembe, novi rotavirusni sevi ali še neznan dejavnik (Steyer in sod., 2009). V nasprotju s Slovenijo so v Evropi v obdobju 2007/2008 v povprečju največ okužb zabeležili v mesecu marcu, vendar se vrhunec pojava rotavirusnih okužb razlikuje od države do države. Prej se namreč pojavijo okužbe na jugu Evrope, ki se postopno širijo proti severu Evrope, prav tako se sezona rotavirusnih okužb začne na zahodu in se nato širi proti vzhodu Evrope. Tako npr. v Španiji rotavirusne okužbe dosežejo vrh v zimskih mesecih, na Madžarskem pa v spomladanskih mesecih. (Iturriza-Gómara in sod., 2009; Iturriza-Gómara in sod., 2010).

## 5.2 PORAZDELITEV ROTAVIRUSNIH GENOTIPOV G IN P

Tudi v letu 2008 se je tako kot leta poprej najpogosteje pojavljal rotavirusni genotip G1 v sestavi z rotavirusnim genotipom P[8]. Določili smo ga kar v 72 % vseh vzorcev. Rotavirusni genotip G1P[8] je najpogostejši genotip pri ljudeh po vsem svetu, njegovo povprečje pojavljanja se namreč giblje med 52-65 % (Genetch in sod., 2006), s tem da v Severni Ameriki, Evropi in v Avstraliji predstavlja veliko večji delež kot v državah v razvoju v Afriki, Južni Ameriki in Aziji (Chandran in sod., 2010). V Evropi je v letu 2008 rotavirusni genotip G1P[8] predstavljal malenkost več kot polovico vseh okužb (53 %),

podobno pojavnost rotavirusnega genotipa G1P[8] pa so zaznali tudi v prejšnjih treh letih (Iturriza-Gómara in sod., 2009; Iturriza-Gómara in sod., 2010). V ZDA so v raziskavi, ki je spremljala pojavnost rotavirusnih genotipov od leta 1996 do leta 2005 dokazali genotip G1P[8] v skoraj 80 % (Genetch in sod., 2006). Nasprotno so v Latinski Ameriki dokazali rotavirusni genotip G1P[8] v 40 % (Castello in sod., 2004), podobno kot v Afriki (Esona in sod., 2010).

Več kot 90 % vseh rotavirusnih okužb po svetu predstavljajo poleg rotavirusnega genotipa G1P[8], tudi rotavirusni genotipi G2P[4], G3P[8], G4P[8] in G9P[8] (Gray in sod., 2008). Podobna razvrstitev rotavirusnih genotipov je vidna tudi pri naši raziskavi. Zanimivo je morda to, da v tem letu nismo dokazali niti enega samega primera rotavirusnega genotipa G3P[8]. V istem letu je tudi v Evropi rotavirusni genotip G3P[8] predstavljal majhen delež, le 3,4 % vseh rotavirusnih okužb (Iturriza-Gómara in sod., 2010). Tudi drugod po svetu se rotavirusni genotip G3P[8] pojavlja v manjši meri. V Aziji se njegov delež giblje med 0 in 5,8 %. Vendar se pojavljajo tudi izjeme, saj so v Vietnamu v obdobju 2006/2007 pri obolelih dokazali kar 83 % rotavirusnega genotipa G3P[8]. Predvidevali so, da je to posledica pomanjkanja zaščite pred rotavirusnim genotipom G3, saj ga niso zaznali že od leta 2000 (Cuong in sod., 2009). Prav tako je bil rotavirusni genotip G3 prevladujoči sev na Kitajskem v obdobju od leta 2001 do leta 2003 (Nelson in sod., 2008). Od leta 2003 naprej pa o vse večjem pojavljanju rotavirusnih genotipov G3P[8] poročajo tudi iz Avstralije (Kirkwood in sod., 2009)

Rotavirusni genotip G2P[4] se je v Sloveniji v letu 2008 pojavil kot drugi najpogostejši genotip. Dokazali smo ga le pri 11 obolelih (7,9 %). Podobno pojavnost rotavirusnega genotipa G2P[4] so zaznali tudi drugod po Evropi (Iturriza-Gómara in sod., 2010). O prevladi rotavirusnega genotipa G2P[4] pa so poročali na Portugalskem v zimskem obdobju v letu 2007, saj je genotip G2P[4] predstavljal kar 68 % vseh rotavirusnih okužb (Antunes in sod., 2009). Prav tako so opazili povečanje števila rotavirusnih okužb z rotavirusnim genotipom G2P[4] pri cepljenih otrocih v Braziliji, zaradi česar so sklepali, da cepivo ne nudi popolne zaščite pred okužbo (Gurgel in sod., 2007).

Pri 10 obolelih otrocih smo dokazali rotavirusni genotip G9P[8]. Rotavirusni genotip G9 se je prvič pojavil v osemdesetih letih prejšnjega stoletja v Indiji. Od leta 1995 naprej pa so o njegovi pojavnosti poročali povsod po svetu, tudi v Evropi. Postal je peti najpogostejši rotavirusni genotip. V Sloveniji so ga prvič dokazali v obdobju 2001/2002 (Steyer in sod., 2005). V zadnjih letih se rotavirusni genotip G9P[8] v Evropi pojavlja kot tretji najpogostejši genotip, v rotavirusni sezoni 2007/2008 je tako predstavljal kar 10, 52 % vseh rotavirusnih okužb (Iturriza-Gómara in sod., 2010).

Četrty najpogosteje določeni rotavirusni genotip G4P[8], smo dokazali v 6 % analiziranih vzorcev. Rotavirusni genotip G4P[8] se zelo pogosto pojavlja tako v Evropi kot drugod po svetu. Običajno je drugi najpogostejši rotavirusni genotip, takoj za genotipom G1P[8]. Takšna pojavnost je opazna tudi v Evropi (Iturriza-Gómara in sod., 2009; Iturriza-Gómara in sod., 2010). V obdobju od leta 1988 do leta 1994 je rotavirusni genotip G4P[8] v Sloveniji predstavljal prevladujoč genotip (Steyer in sod., 2005). Prav tako je bil genotip G4P[8] v obdobju med leti 2004 in 2006 najpogosteje dokazan tudi v Albaniji in Bolgariji (Tcheremenskaia in sod., 2007).

Pri le enem obolelem smo določili rotavirusni genotip G9P[4]. Takšen rezultat smo pričakovali, saj je za rotavirusni genotip G9P[4] značilna redka pojavnost. V Sloveniji so ga prvič dokazali v rotavirusni sezoni 2005/06 (Kralj, 2007). V naslednjem letu pa niso dokazali nobenega primera tega genotipa (Steyer in sod., 2009). Podobna pojavnost rotavirusnega genotipa G9P[4] je opazna tudi drugod v Evropi, saj njegov delež predstavlja manj kot 1 % rotavirusnih okužb (Iturriza-Gómara in sod., 2010).

Iz slike 12 je tudi opazno, da smo uspeli dokazati rotavirusne okužbe z mešanimi rotavirusnimi genotipi; G1+G10P[8], G1+G12P[8] in G9+G12P[8], ki so predstavljale 3,6 % vseh analiziranih vzorcev. Podoben odstotek mešanih rotavirusnih okužb se pojavlja tudi drugod po Evropi (Iturriza-Gómara in sod., 2009) in v ZDA (Gentsch in sod., 2009), medtem ko je v Afriki (Esona in sod., 2010) in v Latinski Ameriki (Castello in sod., 2004) odstotek mešanih okužb veliko višji.

Pri naši raziskavi nas je še zanimalo, kateri rotavirusni genotipi se pri določenih starosti obolelih otrok pojavljajo pogosteje in kateri redkeje ter kako so porazdeljeni glede na letni čas oziroma mesec v letu. Ker nismo imeli enakega števila vzorcev v posameznih starostnih skupinah in po posameznih mesecih, rezultatov nismo predstavili v odstotkih pač pa glede na število analiziranih vzorcev. Zaradi tega tudi primerjava med posameznimi starostnimi skupinami in meseci ni smiselna. Omenimo lahko mogoče le to, da je v starostni skupini od 13 do 24 mesecev, kjer je največ obolelih, pričakovano tudi največja genotipska raznolikost. Kljub različnemu številu vzorcev pa povsod, razen v starostni skupini 49-60 mesecev, prevladuje rotavirusni genotip G1P[8]. Rotavirusni genotip G1P[8] smo najpogosteje dokazali tudi v mesečnem pregledu. Zanimivo je, da smo, kljub velikem številu vzorcev v mesecu januarju, največ različnih rotavirusnih genotipov dokazali v mesecu avgustu.

Zaključna ugotovitev naše raziskave je, da v letu 2008 v ljubljanski regiji ni prišlo do večjih sprememb pri pojavljanju rotavirusnih genotipov. Zaradi nizke precepljenosti otrok, pa tudi v prihodnje ne pričakujemo večjih sprememb v molekularni epidemiologiji rotavirusov (Steyer in sod., 2009).

## 6 SKLEPI

- Analizirali smo 139 vzorcev, od tega največji delež poslanih iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC Ljubljana (88,5 %). Od analiziranih vzorcev je bilo 57 % od obolelih deklic, le 43 % od obolelih dečkov.
- Največ obolelih otrok, vključenih v raziskavo je bilo starih med 13 in 24 mesecem (47 %). Posledično je bila v tem starostnem razredu tudi genotipska raznolikost rotavirusov največja. Najmanj okuženih otrok je bilo v starostnem razredu od 29 do 60 mesecev (4 %). Tudi pri starosti do 6 mesecev je bilo obolelih le 7 % dojenčkov.
- Največ okužb smo z našo raziskavo zaznali v zimskih in zgodnjih spomladanskih mesecih. Primerjava s številom prijavljenih primerov v ljubljanski regiji in drugod po Sloveniji je pokazala podobno porazdelitev rotavirusnih okužb. Po številu analiziranih vzorcev je najbolj izstopal mesec januar (29 %), visok delež okužb pa smo zaznali tudi marca (15 %) in aprila (14 %). Največjo genotipsko raznolikost smo zaznali v mesecu avgustu, kljub temu da je bilo obolelih le 5,8 % otrok. Število analiziranih vzorcev pa se ni popolnoma ujemalo s številom prijavljenih okužb.
- Tudi v letu 2008 smo najpogosteje dokazali rotavirusni genotip G1P[8] in sicer pri kar 72 % vseh analiziranih vzorcev. Pojavljali pa so se tudi rotavirusni genotipi G2P[4] (7,9 %), G9P[8] (7,2 %), G4P[8] (5,8 %), G2P[8] (2,9 %) in G9P[4] (0,7 %).
- 3,6 % vseh analiziranih vzorcev so predstavljale rotavirusne okužbe z mešanimi genotipi: G1+G10P[8], G1+G12P[8] in G9+G12P[8].
- Glede na predhodnje raziskave nismo zaznali večjih sprememb v porazdelitvi rotavirusnih genotipov pred in v obdobju uvedbe rotavirusnega cepiva.

## 7 POVZETEK

Rotavirusi so najpogostejši vzrok drisk pri otrocih do 5. leta starosti. Zaradi rotavirusnih okužb letno umre okrog 500.000 otrok, večina zaradi dehidracije. Več kot 80 % smrti kot posledica rotavirusnih okužb se, zaradi slabšega dostopa do zdravnikov in zdravil, zaradi podhranjenosti in slabšega socialno-ekonomskega statusa, pojavi v revnejših afriških in azijskih državah. V teh državah se pojavlja tudi večja raznolikost rotavirusnih genotipov. Vse to pa so vzroki, ki so spodbudili razvoj cepiv proti rotavirusom. Za nadaljnji razvoj učinkovitejših cepiv je zaradi pojavljanja novih rotavirusnih genotipov potrebno nenehno spremljanje molekularne epidemiologije rotavirusov. V diplomski nalogi smo spremljali pojavljanje rotavirusnih genotipov v ljubljanski regiji v letu 2008 in jih primerjali s pojavljanjem v Evropi in drugod po svetu.

V okviru praktične izvedbe diplomske naloge smo analizirali 139 vzorcev iztrebkov hospitaliziranih otrok do 5. leta starosti, ki so oboleli za akutnim rotavirusnim gastroenteritisom. Vse vzorce smo pridobili iz ljubljanske regije, največ iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC Ljubljana.

Iz vzorcev, ki so bili predhodno redčeni v fosfatnem pufru in shranjeni v zamrzovalniku pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , smo najprej z reagentom Trizol osamili celokupno RNA. Nato smo z metodo enostopenjske reakcije reverzne transkriptaze rotavirusno RNA prepisali v cDNA in DNA pomnožili. Pomnožene odseke genov za VP7 in VP4 smo nato uporabili za nadaljnje določanje genotipov G in P v reakciji vgnedene PCR. Pri reakciji vgnedene PCR smo uporabili tipsko specifične notranje začetne oligonukleotide, ki prilegajo na variabilna mesta pomnoženega gena za VP7 oz. gena za VP4. Nato smo tako dobljene produkte analizirali z agarozno gelsko elektroforezo in s pomočjo aparature za dokumentiranje gelov odčitali velikost pomnoženega dela in tako določili rotavirusni genotip vzorca.

Ugotovili smo, da je bila največja genotipska raznolikost pri otrocih starih med 13 in 24 mesecem. V tem starostnem razredu je bilo tudi največ obolelih otrok (47 %), najmanj obolelih pa je bilo v starostnem obdobju od 29 do 60 mesecev (4 %). Največ obolelih je

bilo v zimskih (januar - 29 %) in spomladanskih (marec - 15 %, april - 14 %) mesecih. V večini vzorcev (72 %) smo dokazali rotavirusni genotip G1P[8]. Zaznali pa smo tudi rotavirusne genotipe: G2P[4] (7,9 %), G9P[8] (7,2 %), G4P[8] (5,8 %), G2P[8] (2,9 %) in G9P[4] (0,7 %). V 4 % analiziranih vzorcev smo dokazali mešane rotavirusne genotipe: G1+G10P[8], G1+G12P[8] in G9+G12P[8].



## 8 VIRI

Anderson E.J., Weber S.G. 2004. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infectious Disease*, 4: 91-99

Antunes H., Afonso A., Iturriza M., Martinho I., Ribeiro C., Rocha S., Magalhães C., Carvalho L., Branca F., Gray J. 2009. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *Journal of Clinical Virology*, 45: 76-78

Asensi M.T., Martinez-Costa C., Buesa J. 2006. Anti-rotavirus antibodies in human milk: Quantification and neutralizing activity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42: 560-567

Bishop R. 2009. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24: 81-85

Blutt S.E., Conner M.E. 2007. Rotavirus: to the gut and beyond! *Current Opinion in Gastroenterology*, 23: 39-43

Boshuizen J.A. 2005. Pathogenesis of rotavirus infection. Rotterdam, Erasmus University Rotterdam: Thesis: 10- 23

Carter J.B., Saunders V.A. 2007. *Virology: Principles and applications*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 147 -156

Castello A., Arvay M.L., Glass R.I., Gentsch J. 2004. Rotavirus strain surveillance in Latin America - a review of the last nine years. *Pediatrics Infectious Disease Journal*, 23, 10: 168-172

Chandran A., Fitzwater S., Zhen A., Santosham M. 2010. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: Rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics: Targets & Therapy*, 4: 213-229

Ciarlet M., Schödel F. 2009. Development of a rotavirus vaccine: Clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq®. *Vaccine*, 27, Suppl. 6: G72-G81

Cook N., Bridger J., Kendall K., Iturriza-Gómara M., El-Attar L., Gray J. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *Journal of Infection*, 48: 289-302

Cuong N.T., Minh N.B., Anh D.D., Thu N.H., Tu N.T., Nam T.V., Thuy V.T., Ogino M., Alam M., Nakagomi T., Nakagomi O., Yamashiro T. 2009. Molecular epidemiology of rotavirus diarrhoea among children in Haiphong, Vietnam: The emergence of G3 rotavirus. *Vaccine*, 27, Suppl. 5: F75-F80

Dennehy P.H. 2008. Rotavirus vaccines: an overview. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 1: 198-208

Desselberger U., Wolleswinkel-van den Bosch J., Murkowicz J., Rodrigo C., Giaquinto C., Vesikari T. 2006. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatrics Infectious Disease Journal*, 25,1: 30-41

EMA 2007. Evropsko javno poročilo o oceni zdravila (EPAR) Rotateq: povzetek EPAR za javnost. London, EMA – European Medicines Agency: 2 str.

[http://www.ema.europa.eu/docs/sl\\_SI/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000669/WC500054181.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000669/WC500054181.pdf) (15. nov. 2010)

EMA 2009. Rotarix cepivo proti rotavirusu, živo: povzetek EPAR za javnost. London, EMA - European Medicines Agency: 2 str.

[http://www.ema.europa.eu/docs/sl\\_SI/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000639/WC500054587.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000639/WC500054587.pdf) (15. nov. 2010)

- Esona M.D., Steele D., Kerin T., Armah G., Peenze I., Geyer A., Page N., Nyangao J., Akran Agbaya V., Trabelsi A., Tsion B., Aminu M., Sebunya T., Dewar J., Glass R., Gentsch J. 2010. Determination of the G and P types of previously nontypeable rotavirus strains from the African Rotavirus Network, 1996–2004: Identification of unusual G types. *Journal of Infection Diseases*, 202: 49-54
- Estes M.K., Kapikian A.Z. 2007. Rotaviruses. V: *Fields virology*. 5<sup>th</sup> ed. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1917 -1972
- 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: 1365-1373
- Gentsch J.R., Hull J.J., Teel E.N., Kerin T.K., Freeman M.M., Esona M.D., Griffin D.D., Bielfelt-Krall B.P., Banyai K., Jiang B., Cortese M.M., Glass R.I., Parashar U.D., Collaborating laboratories of the National Rotavirus Strain Surveillance System. 2009. G and P types of circulating rotavirus strains in the United States during 1996–2005: Nine years of prevaccine data. *Journal of Infection Diseases*, 200: 99-105
- Glass R.I., Parashar U.D., Brese J.S., Turcios R., Fisher T.K., Widdowsin M.A., Jiang B., Gentsch J.R. 2006. Rotavirus vaccines: Current prospects and future challenges. *Lancet*, 368: 323-332
- Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., Fang Z.Y. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 276-282
- Gray J., Vesikari T., Van Damme P., Giaquinto C., Mrukowicz J., Guarino A., Dagan R., Szajewska H., Usonis V. 2008. Rotavirus. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 46: 24-31

Greenberg H.B., Estes M.K. 2009. Rotaviruses: From pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136: 1939-1951

Gurgel R.Q., Cuevas L.E., Vieira S., Barros V., Fontes P.B., Salustino E.F., Nakagomi O., Nakagomi T., Dove W., Cunliffe N., Hart C.A. 2007. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 10: 1571-1573

Iturriza-Gómara M., Cubitt D., Steele D., Green J., Brown D., Kang G., Desselberger U., Gray J. 2000. Characterisation of rotavirus G9 strains isolated in the UK between 1995 and 1998. *Journal of Medical Virology*, 61: 510-517

Iturriza-Gómara M., Dallman T., Bányai K., Böttiger B., Buesa J., Diedrich S., Fiore L., Johansen K., Koopmans M., Korsun N., Koukou D., Kroneman A., Lappalainen M., László B., Maunula L., Mas Marques A., Matthijnssens J., Midgley S., Mladenova Z., Nawaz S., Poljšak-Prijatelj M., Pothier P., Ruggeri F.M., Sanchez-Fauquier A., Steyer A., Sidaraviciute-Ivaskeviciene I., Syriopoulou V., Tran A.N., Usonis V., Van Ranst M., de Rougemont A., Gray J. 2010. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet , a pan European collaborative strain surveillance network. *Epidemiology and Infection*, 1: 1-15

Iturriza-Gómara M., Dallman T., Bányai K., Böttiger B., Buesa J., Diedrich S., Fiore L., Johansen K., Korsun N., Kroneman A., Lappalainen M., László B., Maunula L., Matthijnssens J., Midgley S., Mladenova Z., Poljšak-Prijatelj M., Pothier P., Ruggeri F.M., Sanchez-Fauquier A., Scheier E., Steyer A., Sidaraviciute I., Tran A. N., Usonis V., Van Ranst M., de Rougemont A., Gray J. 2009. Rotavirus surveillance in Europe, 2005 -2008: Web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *Journal of Infection Diseases*, 200: 215-221

Iturriza-Gómara M., Kang G., Gray J. 2004. Rotavirus genotyping: Keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *Journal of Clinical Virology*; 3: 259-265

IVZ RS. 2010. Rotavirusne okužbe. CNB novice. Ljubljana, IVZ RS - Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 2 str.

[http://www.ivz.si/?ni=104&pi=5&\\_5\\_FileName=159.pdf&\\_5\\_MediaId=159&\\_5\\_AutoResize=false&pl=104-5.3](http://www.ivz.si/?ni=104&pi=5&_5_FileName=159.pdf&_5_MediaId=159&_5_AutoResize=false&pl=104-5.3) (5. nov. 2010)

IVZ RS. 2008. Prijavljeni izbruhi nalezljivih bolezní v Sloveniji. CNB novice – letnik 2008. Ljubljana, IVZ RS - Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije

[http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=104&pi=5&\\_5\\_id=591&\\_5\\_PageIndex=1&\\_5\\_groupId=218&\\_5\\_newsCategory=&\\_5\\_action=ShowNewsFull&pl=104-5.0](http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=104&pi=5&_5_id=591&_5_PageIndex=1&_5_groupId=218&_5_newsCategory=&_5_action=ShowNewsFull&pl=104-5.0) (5. nov. 2010)

Kirkwood C.D., Boniface K., Bogdanovič-Sakran N., Masendycz P., Barnes G., Bishop R.F. 2009. Rotavirus strain surveillance - an Australian perspective of strains causing disease in hospitalised children from 1997 to 2007. *Vaccine*, 27, Suppl. 5: F102-F107

Kralj I. 2007. Določanje rotavirusnih genotipov pri hospitaliziranih otrocih z gastroenteritisom. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 58 str.

Levy K., Hubbard A.E., Eisenberg J.N., 2008. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*: 1-10

Malik J., Bhan M.K., Ray P. 2008. Natural immunity to rotavirus infection in children. *Indian Journal of Biochemistry*, 45: 219-228

Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M.K., Gentsch J.R., Iturriza-Gómara M., Kirkwood C.D., Martella V., Mertens P.P.C., Nakagomi O.; Patton J.T., Ruggeri F.M., Saif L.J., Santos N., Steyer A., Taniguchi K.,

- Desselberger U., Van Ranst M. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of Virology*, 153: 1621-1629
- Nelson E.A.S., Bresse J.S., Parashar U.D., Widdowson M.-A., Glass R.I., the members of the Asian Rotavirus Surveillance Network. 2008. Rotavirus epidemiology: The Asian rotavirus surveillance network. *Vaccine*, 26: 3192-3196
- O’Ryan M. 2009. The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 28, 3: 60-62
- Parashar U.D., Bresse J.S., Gentsch J.R., Glass R.I. 1998. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 4: 561-570
- Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infections Diseases*, 12, 2: 304-306
- Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresse J.S., Miller M.A., Glass R.I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infections Diseases*, 9, 5: 565-572
- Pesavento J.B., Crawford S.E., Estes M.K., Prasad B.V. 2006. Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 309: 189-219
- Ramig R.F. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*, 78, 19: 10213-10220
- Steyer A. 2002. Genotipi G in P rotavirusne skupine A v Sloveniji v letih 1988 do 1994. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 51 str.

- Steyer A., Bajželj M., Žnuderl K., Berce I., Drinovec B., Harlander T., Orešič N., Ravnik M., Štorman A., Trkov M., Poljšak-Prijatelj M. 2009. Molecular epidemiology of rotaviruses during rotavirus vaccine introduction in Slovenia. *Zdravstveni Vestnik*, 78: 381-386
- Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Barlič-Maganja D., Bufon T., Marin J. 2005. The emergence of rotavirus genotype G9 in hospitalised children in Slovenia. *Journal of Clinical Virology*, 33: 7-11
- Steyer A., Poljšak-Prijatelj M., Lužnik Bufon T., Marčun-Varda N., Marin J. 2007. Rotavirus genotypes in Slovenia: Unexpected detection of G8P[8] and G12P[8] genotypes. *Journal of Medical Virology*, 79: 626-632
- 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: 2179-2204
- Ward R. 2009. Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 28, 3: 57-59
- Ward R., McNeal M.M., Steele D.A. 2008. Why does the world need another rotavirus vaccine? *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4, 1: 49-63

## ZAHVALA

Posebna zahvala gre mojemu somentorju dr. Andreju Steyerju, ki mi je bil pri izdelavi diplome v največjo pomoč. Hvala za ves vložen trud in čas pri opravljanju in pisanju diplomske naloge ter za tako hitro organizacijo zagovora diplome. Hvala tudi za vso razumevanje, koristne nasvete in prijazno ter sproščeno vzdušje pri laboratorijskem delu.

Za hiter in strokoven pregled diplomske naloge se zahvaljujem mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu in recenzentki prof. dr. Tatjani Avšič-Županc ter strok. sod. Mateji Poljšak-Prijatelj.

Zahvaljujem se tudi Mojci Bajželj za vso pomoč in napotke pri uvajanju v laboratorijsko delo.

Najlepše se zahvaljujem tudi svoji družini, mami Marjani, očetu Milanu, sestri Metki in bratu Žigu. Hvala za vso nesebično ljubezen, toplino in dobroto. Hvala, ker ste mi pomagali v težkih trenutkih in se z mano veselili ob uspehih. Hvala tudi, da ste verjeli vame in me spodbujali vsa leta šolanja. Mami in ati, hvala, da sta me vzgojila v osebo, kakršna sem danes.

Zahvaljujem se tudi svojemu fantu Marku. Hvala za spodbudne besede pri pisanju diplomske naloge, za razreševanje težav pri oblikovanju diplomske naloge ter za vso ljubezen, ki mi jo izkazuješ. Svet brez tebe ne bi bil pisana paleta barv, temveč monotona črnina brez upanja v lepše življenje.

Za spodbudo in podporo pri pisanju diplomske naloge se zahvaljujem tudi družini Kranjc, še posebej Mateju, ki mi je pomagal pri razumevanju angleščine.

Nenazadnje pa bi se rada zahvalila tudi sošolkam, Vesni Marčič, Vesni Vogrič in Sonji Vesel za nepozabna študentska leta in vso pomoč tekom študija.