

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela FURAR

**MOLEKULARNO DOLOČANJE ČLOVEŠKIH
SAPOVIRUSOV V IZTREBKIH BOLNIKOV,
OBOLELIH ZA VIRUSNIM GASTROENTERITISOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela FURAR

**MOLEKULARNO DOLOČANJE ČLOVEŠKIH SAPOVIRUSOV V
IZTREBKIH BOLNIKOV, OBOLELIH ZA VIRUSNIM
GASTROENTERITISOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**MOLECULAR DETECTION OF HUMAN SAPOVIRUSES IN
FAECAL SAMPLES OF PATIENTS WITH VIRAL
GASTROENTERITIS**

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 na Inštitutu 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 somentorico asist. strok. svet. dr. Matejo Poljšak-Prijatelj in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič-Županc.

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec

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

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

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

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

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC

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

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela Furar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.835.3:578.7(043)=163.6
- KG virusi/*Caliciviridae*/človeški sapovirusi/virusni gastroenteritis/RT-PCR v realnem času
- AV FURAR, Špela
- SA PETROVEC, Miroslav (mentor)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (somentorica)/AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2010
- IN MOLEKULARNO DOLOČANJE ČLOVEŠKIH SAPOVIRUSOV V IZTREBKIH BOLNIKOV, OBOLELIH ZA VIRUSNIM GASTROENTERITISOM
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 41 str., 4 pregl., 15 sl., 49 vir.
- IJ Sl
- JI sl/en
- AI V diplomski nalogi smo testirali 232 vzorcev iztrebkov bolnikov, pri katerih je glede na klinične znake in simptome, kot so driska in/ali bruhanje, obstajal sum na virusno povzročeni gastroenteritis. Te vzorce so predhodno testirali in potrdili vsaj enega povzročitelja virusnega gastroenteritisa ali pa so ta sum ovrgli. Kot vzorčno obdobje smo izbrali jesensko-zimske mesece 2008/09 v Sloveniji. Z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo v realnem času smo pri devetih vzorcih dokazali RNA sapovirusov. Vsi pozitivni bolniki so bili bolnišnično zdravljeni in so bili mlajši od 12 let. Dvotretjinski delež obolelih za okužbo s sapovirusi predstavljajo deklice (6/9). Največji odstotek obolelih je bil v mesecu decembru leta 2008. Pri petih so v vzorcu predhodno dokazali vsaj enega izmed povzročiteljev virusnega gastroenteritisa, pri štirih pa je bil vzorec določen kot negativen in potrjuje samostojno okužbo s sapovirusi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 578.835.3:578.7(043)=163.6

CX Viruses/*Caliciviridae*/human sapoviruses/viral gastroenteritis/real-time RT-PCR

AU FURAR, Špela

AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/POLJŠAK-PRIJATELJ, Mateja (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 MOLECULAR DETECTION OF HUMAN SAPOVIRUSES IN FAECAL SAMPLES OF PATIENTS WITH VIRAL GASTROENTERITIS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX., 41 p., 4 tab., 15 fig., 49 ref.

LA sl

AL sl/en

AB To identify sapovirus RNA we examined 232 faecal samples collected from hospitalised patients with symptoms of vomiting and/or diarrhoea. All specimens were previously examined for other viral causative agents of gastroenteritis. Stool samples were randomly collected from autumn to winter months 2008/2009 in Slovenia. Using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction we detected sapovirus RNA in stool from 9 patients. All were under 12 years of age. Two thirds (6/9) of sapovirus infected patients were girls. We detected a clear peak with sapovirus infections in December 2008. In 5 from 9 sapovirus positive samples, additional virus was detected, whereas in 4 from 9 samples only sapovirus was found.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.1.1 Cilji naloge	2
1.1.2 Delovne hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KLASIFIKACIJA IN TAKSONOMSKA UREDITEV SAPOVIRUSOV	3
2.2 MORFOLOGIJA SAPOVIRUSOV	4
2.3 GENOM SAPOVIRUSOV	4
2.4 PATOGENEZA SAPOVIRUSOV	6
2.4.1 Življenjski cikel.....	6
2.4.2 Bolezen.....	6
2.4.3 Klinični znaki in simptomi.....	8
2.4.4 Vir okužbe in prenos	9
2.4.5 Epidemiologija	10
2.4.6 Dignostika.....	11
2.4.6.1 Princip delovanja RT-PCR v realnem času	12
2.4.7 Zdravljenje in preprečevanje okužb.....	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Vzorci.....	16
3.1.2 Komercialni komplet za osamitev virusne RNA (IPrep™ Virus kit, Invitrogen).....	16
3.1.2.1 Reagenti v iPrep™PureLink™ kartuši.....	16

3.1.3 Reagenti za pomnoževanje virusne RNA z RT-PCR v realnem času	17
3.1.3.1 Začetna oligonukleotida in oligonukleotidna sonda (Preglednica 1)	17
3.1.3.2 Testni komplet AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit za pomnoževanje virusne RNA (Ambion)	17
3.1.4 Laboratorijska oprema	17
3.2 METODE	19
3.2.1 Shema analize	19
3.2.2 Priprava iztrebkov	19
3.2.3 Osamitev virusne RNA (iPrep™ virus kit, Invitrogen)	19
3.2.4 Izvedba RT-PCR v realnem času	20
4 REZULTATI	23
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	29
5.1 RAZPRAVA	29
5.2 SKLEPI	33
6 POVZETEK	34
7 VIRI	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o začetnih oligonukleotidih in oligonukleotidni sondi	17
Preglednica 2: Prikaz stopenj reakcije RT-PCR v realnem času	21
Preglednica 3: Pregled vseh analiziranih vzorcev glede na leto vzorčenja, spol in rezultat analize.....	23
Preglednica 4: Prikaz pozitivnih bolnikov na sapoviruse, njihovi osebni podatki ter podatki analize.....	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogram glede na primerjave nukleotidnih zaporedij celotnega kapsidnega gena (Green in sod., 2000)	3
Slika 2: Elektronska mikroskopija norovirusov (A), NVL delcev (B) ter sapovirusov (C). Merilo, 100nm (Atmar in Estes, 2001).....	4
Slika 3: Organizacija genomov kalicivirusov. Predstavnika rodu sapovirus je sev HuCV/SLV/Manchester/1993/UK (GenBank acc. no. X86560) (Green in sod., 2000).	6
Slika 4: Prikaz kliničnih znakov in simptomov gastroenteritisa, povzročene s sapovirusi, glede na starost bolnikov (Rockx in sod., 2002)	8
Slika 5: Poti prenosa in kontaminacije s sapovirusi (Moreno-Espinosa in sod., 2004).....	10
Slika 6: Izris grafa metode RT-PCR v realnem času, ki ga spremljamo preko računalniške prigradske opreme (Wong in Medrano, 2005).	14
Slika 7: Shema poteka analize	19
Slika 8: Grafični prikaz načina spremljanja rezultatov z metodo RT-PCR v realnem času	22
Slika 9: Grafični prikaz števila negativnih in pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na delež le-teh po času vzorčenja	24
Slika 10: Grafični prikaz števila negativnih in pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na delež le-teh po letih.....	24
Slika 11: Grafični prikaz pozitivnih bolnikov na sapoviruse glede na starost in spol.....	25
Slika 12: Grafični prikaz negativnih in pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na spol ...	25
Slika 13: Grafični prikaz deleža pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na predhodne analize.....	26
Slika 14: Grafični prikaz negativnih in pozitivnih bolnikov na sapoviruse.....	27
Slika 15: Prikaz rezultatov analize z metodo RT-PCR v realnem času.....	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	Dušikova baza adenin
bp	Bazni par
C	Dušikova baza citozin
cDNA	Komplementarna DNA (ang.: Complementary DNA)
ddH ₂ O	Demineralizirana destilirana voda
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (ang.: Deoxyribonucleic acid)
EIA	Encimskoimunski test (ang.: Enzymeimmuno assay)
ELISA	Encimskoimunski test (ang.: Enzyme-linked immuno sorbent assay)
G	Dušikova baza gvanin
GG(I-V)	Genska skupina (I-V)
HACCP	Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (ang.: Hazard analysis and critical control points)
ICTV	Mednarodno združenje za taksonomijo virusov (ang.: The International Committee on Taxonomy of Viruses)
IEM	Imunska elektronska mikroskopija (ang.: Immune electrone microscopy)
kb	Kilobaza
nt	Nukleotid
ORF	Odprt bralni okvir (ang.: Open reading frame)
RIA	Radioimunski test (ang.: Radioimmuno assay)
RNA	Ribonukleinska kislina (ang.: Ribonucleic acid)
RT-PCR	Verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (ang.: Reverse transcription-polimerase chain reaction)
SV-F	Sapovirus <i>forward</i> začetni oligonukleotid
SV-R	Sapovirus <i>reverse</i> začetni oligonukleotid
SV-P	Sapovirus oligonukleotidna sonda (ang.: Sapovirus probe)
T	Dušikova baza timin
UKC	Univerzitetni klinični center Ljubljana
VPg	Virusna beljakovina g (ang.: Viral protein g)

1 UVOD

Človeški sapovirusi, skupaj z norovirusi (rodova iz družine *Caliciviridae*), povzročajo virusni gastroenteritis, z nastankom najpogostejših simptomov kot sta driska in bruhanje. Virusi se prenašajo po fekalno-oralni poti v času pojava kliničnih znakov ter tudi v času prebolevanja (Yoshida in sod., 2009). Otroci zbolevalo pogosteje, kot odrasli. Okužba se hitro razširi znotraj zaprte skupine ljudi, kot so zdravstvene, šolske ustanove in domov za ostarele. Pri zdravih ljudeh simptomi izzvenijo sami, pri imunsko oslabelelih pa lahko okužba povzroči nevarnejše dehidracije (Moreno-Espinosa in sod., 2004).

Pred razvojem molekularnih metod, je diagnostika kalicivirusov temeljila na elektronski mikroskopiji, ki pa je dokaj neobčutljiva in nespecifična metoda, saj mora biti koncentracija virusov v vzorcu vsaj 10^6 /ml. Z metodami elektronske mikroskopije pogosto morfološko ne moremo ločiti norovirusov in sapovirusov (Rabenau in sod., 2003).

Od leta 2002 se povečuje število prijavljenih izbruhov kalicivirusnega gastroenteritisa, zaradi česar se je pojavila potreba po hitri in občutljivi diagnostični metodi za dokaz norovirusov in sapovirusov. Ta metoda je verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) v realnem času (Svraka in sod., 2009).

V Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani noroviruse dokazujejo z metodami neposredne elektronske mikroskopije, encimskoimunskim testom (ELISA) ter z RT-PCR v realnem času, medtem ko sapoviruse le z elektronsko mikroskopijo.

1.1 NAMEN DELA

1.1.1 Cilji naloge

V vzorcih, sprejetih v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, katere so predhodno pregledali na povzročitelje virusnega gastroenteritisa z elektronsko mikroskopijo, encimskoimunskim testom ter z molekularno metodo reverzne transkripcije verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) v realnem času, na rotaviruse, adenoviruse, astroviruse in noroviruse, smo želeli testirati z molekularno metodo reverzne transkripcije verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) v realnem času še na sapoviruse. Želeli smo ugotoviti kolikšen je odstotek okužb s sapovirusi pri bolnikih s sumom na virusno povzročeni gastroenteritis, ter ugotoviti možno povezanost med okužbo in spolom, starostjo in mesecem nastanka okužbe.

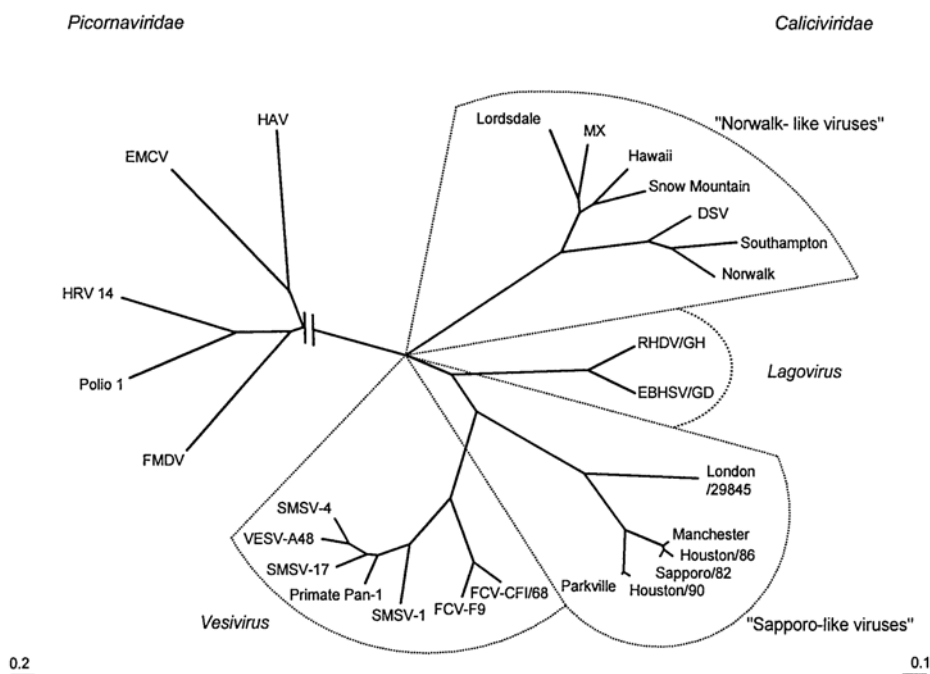
1.1.2 Delovne hipoteze

Iz predhodnih raziskav smo pričakovali, da bo odstotek okužb s človeškimi sapovirusi od 5-10 %. Največ tovrstnih okužb pričakujemo pri otrocih, saj so to potrdile že nekatere raziskave (Johnsen in sod., 2009).

2 PREGLED OBJAV

2.1 KLASIFIKACIJA IN TAKSONOMSKA UREDITEV SAPOVIRUSOV

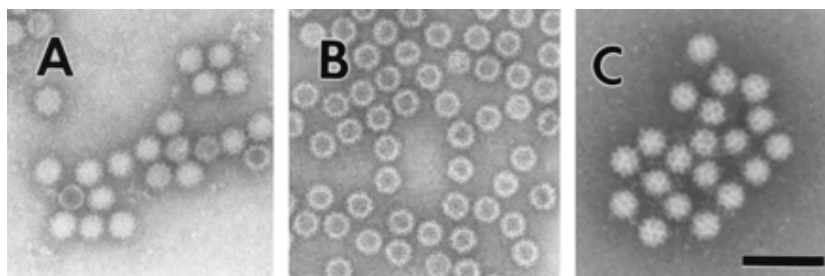
Rod *Sapovirus* je uvrščen v družino *Caliciviridae*. Viruse iz tega rodu so včasih imenovali »Sapporu podobni virusi« (ang.: »Sapporo-like« virus). V sedmem poročilu Mednarodnega združenja za taksonomijo virusov (ICTV) so leta 1998 po filogenetskih analizah uvrstili v družino *Caliciviridae* 4 rodove: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* in *Sapovirus* (Slika 1). Zadnja dva pri človeku povzročata virusni akutni gastroenteritis. Tipska vrsta sapovirusov je virus Sapporo, katerega ime izvira iz Japonskega mesta Sapporo, kjer so leta 1977 ugotovili prvi izbruh sapovirusov (Chiba in sod., 2000). Tipska vrsta je najnižja raven hierarhične klasifikacije po ICTV, zato se naprej razvrščamo ter poimenujemo po kriptogramu: gostiteljski organizem/okrajšava rodu/ime virusa/leto pojava/država pojava. Primer takega poimenovanja je sev po katerem je dobil rod tudi ime: Hu/SLV/Sapporo/1982/JP (Green in sod., 2000).



Slika 1: Filogram glede na primerjave nukleotidnih zaporedij celotnega kapsidnega gena (Green in sod., 2000)

2.2 MORFOLOGIJA SAPOVIRUSOV

Sapovirusi so ikozaedrični virusi brez ovojnice s simetrijo $T=3$. V premeru so veliki od 27 do 40 nm. Virusno kapsido sestavlja 180 molekul kapsidne beljakovine VP1. Ime kalicivirusov prihaja iz latinske besede »*calyx*«, kar pomeni čaša in se nanaša na čašasto obliko virionov, vidnih z elektronskim mikroskopom (Atmar in Estes, 2001). Pri sapovirusih pa so raziskovalci pisali o podobnosti morfologije z Davidovo zvezdo (Chiba in sod., 2000).



Slika 2: Elektronska mikroskopija norovirusov (A), NVL delcev (B) ter sapovirusov (C). Merilo, 100nm (Atmar in Estes, 2001)

Človeški sapovirusi se ne razmnožujejo v celičnih kulturah. Ekspresija kapsidne beljakovine v žuželčjih in sesalčjih celicah je možna, saj so dokazali samosestavljanje te beljakovine v virusom podobne delce (ang.: »Virus-like particles«, VLPs), z enako morfologijo kot virioni. S tem so dokazali, da morfologijo kalicivirusov določa kapsidna beljakovina (Numata in sod., 1997; Oka in sod., 2006).

2.3 GENOM SAPOVIRUSOV

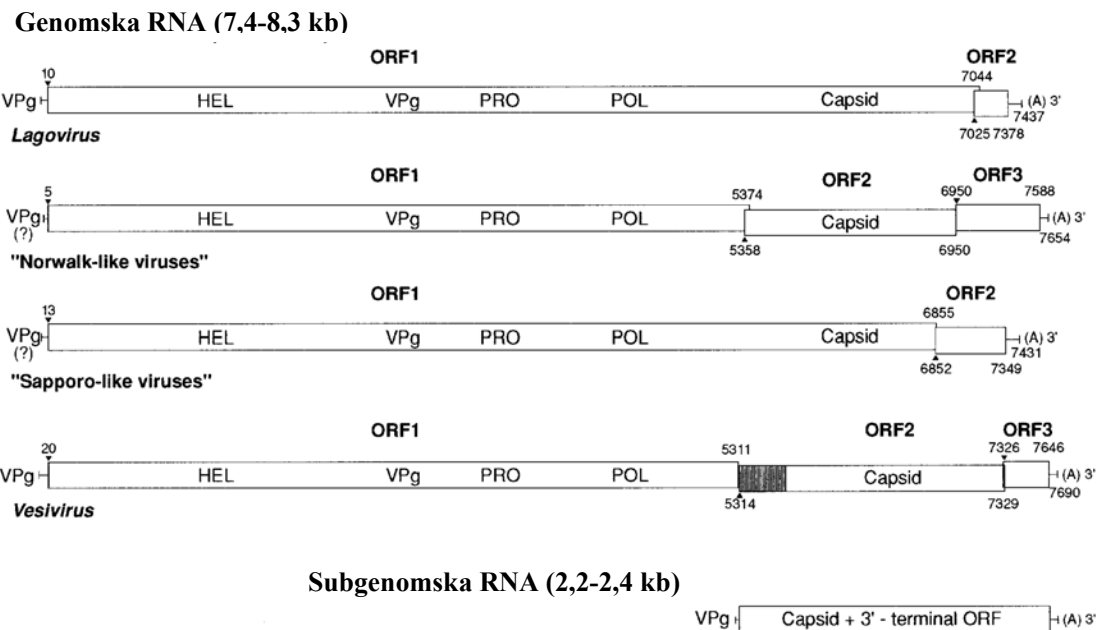
Genom sapovirusov sestavlja linearna enojnovijačna pozitivno polarna ribonukleinska kislina (RNA), ki je dolga od 7.3 do 7.5 kb (Yoshida in sod., 2009). Predvidevajo, da genom vsebuje dva do tri odprte bralne okvirje (ang.: Open reading frame, ORF). Na 5' koncu je 12 nt dolgo vodilno zaporedje, kateremu sledi iniciacijski kodon AUG (Clarke in Lambden, 2000). ORF1 kodira nestrukturni poliprotein in glavno kapsidno beljakovino (VP1), medtem ko ORF2 kodira kapsidno beljakovino (VP2) in ORF3 beljakvine, katerih funkcije še niso znane (Oka in sod., 2006).

Nestrukturni poliprotein se v kotranslacijskem procesu s pomočjo virusne proteaze razreže v nestrukturne beljakovine - p48, helikazo, p113, VPg proteazo, od RNA odvisno RNA polimerazo, kapsidno beljakovino -, ki sodelujejo pri replikaciji virusnega genoma. VPg protein naj bi z vezavo na 5' koncu genoma tvoril iniciacijski kompleks za začetek translacije prvega bralnega okvirja (Clarke in Lambden, 2000). Na 3' koncu ORF2 sledi od 55 do 82 nukleotidov dolga nekodirajoča regija (ang.: 3' untranslated region, 3' UTR), kateri sledi poli(A) rep variabilne dolžine (Fullerton in sod., 2007).

Organizacija genoma sapovirusov je podobna organizaciji genoma kunčjih kalicivirusov (ang.: Rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV) iz rodu *Lagovirus*. S tem mislimo na podobnost v fuziji genov za nestrukturne beljakovine in gena za kapsidno beljakovino v skupni ORF1 (Atmar in Estes, 2001).

Genom sapovirusov verjetno vsebuje še en kratek ORF, ki kodira manjšo beljakovino dolgo 161 aminokislin (Clarke in Lambden, 2000). Ta ORF3 prekriva N-terminalni del ORF1 na mestu kapsidnega gena. To je značilno le za genske skupine GGI, GGIV in GGV (Okada in sod., 2006). S sekvencioniranjem so dokazali 7 nukleotidov dolgo ohranjeno zaporedje znotraj kapsidnega gena, natančneje 11 nt naprej od kapsidnega start kodona, GCAAUGG, z iniciacijskim kodonom AUG za ORF3, zaradi česar je ta regija močno nagnjena k začetku translacije (Clarke in Lambden, 2000; Schuffenecker in sod., 2001). Zaradi visoke ohranjenosti te regije genoma, raziskovalci predvidevajo, da se med virusno replikacijo izraža biološko aktivna beljakovina, saj na take regije deluje močan selekcijski pritisk, ki preprečuje nastanek mutacij (Clarke in Lambden, 2000).

Na podlagi nukleotidnega zaporedja gena kapsidne beljakovine VP1, razvrščamo sapoviruse v 5 genskih skupin (GGI-GGV). Sevi genskih skupin GGI, GGII, GGIV in GGV okužijo človeka, medtem ko sevi GGIII okužijo prašiče (Hansman in sod., 2007a). Prevladujoča genska skupina po vsem svetu je GGI. Vsako gensko skupino lahko dalje razdelimo v genotipe, ki opisujejo seve, ki se med seboj razlikujejo v približno 10% v nukleotidnem ali aminokislinskem zaporedju (Hansman in sod., 2007b).



Slika 3: Organizacija genomov kalicivirusov. Predstavnika rodu sapovirus je sev HuCV/SLV/Manchester/1993/UK (GenBank acc. no. X86560) (Green in sod., 2000).

2.4 PATOGENEZA SAPOVIRUSOV

2.4.1 Življenjski cikel

Virus se pritrdi na receptor na površini gostiteljske celice. Sledi t.i. slačenje in sprostitvev virusne genomske RNA v citoplazmo gostiteljske celice. Beljakovina VPg, ki je na 5' koncu virusne RNA, se odstrani in se kasneje prevede v poliprotein z namenom tvorbe zrelih nestrukturiranih beljakovin, ki sodelujejo pri RNA transkripciji.

Virusna genomska RNA je matrica za sintezo negativne polarne komplementarne enovijačne RNA. Po ekspresiji RNA nastanejo bazne beljakovine kot tudi kapsidna beljakovina. Sledi sestavljanje virusa in sprostitvev novih virionov (Viral zone: Sapovirus, 2010).

2.4.2 Bolezen

Sapovirusi povzročajo akutni gastroenteritis. Okužba prizadene najpogosteje dojenčke, otroke, starejše in osebe z oslabeлим imunskim sistemom (Cunliffe in sod., 2010). Opisani

so tudi smrtni primeri (Phan in sod., 2004). National Institute of Allergy and Infectious Diseases uvršča sapoviruse v kategorijo B patogenov biološke varnosti, poleg virusa hepatitisa A ter nekaterih bakterij, gliv in parazitov (Matson in Szücs, 2003).

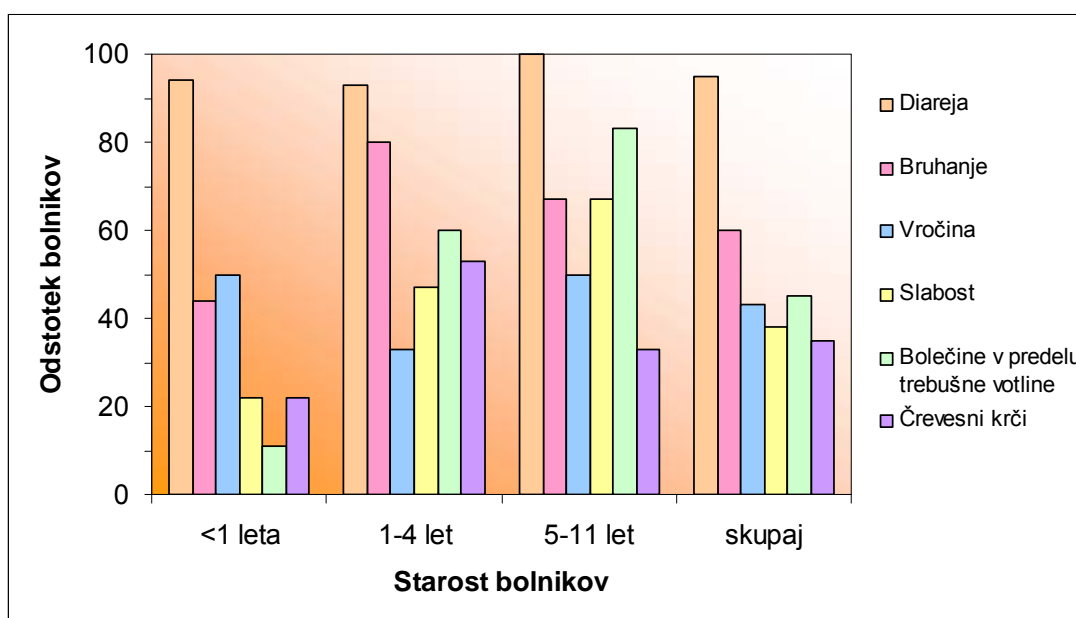
Okužbo povzroči že 10 do 100 virusov (Schaub in Oshiro, 2000). Inkubacijska doba je navadno od 24 do 48 ur (Moreno-Espinosa in sod., 2004). Pri okužbi je motena absorpcija vode in hranilnih snovi v črevesju, zaradi česar nastane driska. Predvidevajo, da se virusi razmnožujejo v zgornjem prebavnem traktu, čeprav po biopsiji dvanajstnika niso dokazali histopatoloških lezij. Opazili so le skrajšane in odebeljene resice tankega črevesja, medtem ko je sluznica ostala histološko nespremenjena. To so potrdili s transmisijskim elektronskim mikroskopom (Green in sod., 2001). Bolniki največkrat okrevaljo brez zapletov. Ti se pojavijo le v primerih, ko ni možnosti za dovajanje rehidracijske raztopine (Moreno-Espinosa in sod., 2004). Izločanje virusov običajno traja do 2 tedna. Pri mlajših otrocih je ta doba lahko še daljša. Viruse so določili v iztrebkih tudi mesec dni po nastopu bolezni, ko so klinični znaki že izzveneli (Rockx in sod., 2002). Okužba s sapovirusi je najpogostejša pri otrocih do petega leta starosti (Rockx in sod., 2002). Leta 2004 so raziskali izbruh gastroenteritisa v bolnišnici na Švedskem, kjer naj bi 80-letna bolnica okužila medicinsko osebje. To pa je bil tudi prvi opisan izbruh gastroenteritisa povzročenega s sapovirusi med odraslimi (Johansson in sod., 2005).

Dokazano je, da sapovirusi povzročajo tudi asimptomatsko okužbo pri odraslih, ki pa je glede na virusno breme prav tako resna kot pri simptomatskih okužbah, saj bolniki predstavljajo vir prenosa in možnost nastanka izbruha. Pri študentih s simptomatsko okužbo je bilo virusno breme od 10^6 do 10^{11} cDNA kopij na gram iztrebka, medtem ko pri asimptomatski okužbi od 10^7 do 10^{10} cDNA kopij na gram iztrebka (Yoshida in sod., 2009).

Proizvajanje protiteles proti sapovirusom se zaradi izpostavljenosti prične že zgodaj v življenju. Prve 3 mesece dojenčke ščitijo materina protitelesa (Numata in sod., 1997), nato pa se količina protiteles do 2. leta starosti močno poveča (Phan in sod., 2005).

2.4.3 Klinični znaki in simptomi

Glavna klinična znaka okužbe s sapovirusi sta driska in bruhanje, katerima se pogosto pridružijo še bolečine v predelu trebuha, črevesni krči, slabost, povišana telesna temperatura (nad 37, 5 °C) in prisotnost sluzi v blatu. Pogostost zgoraj naštetih simptomov se razlikuje glede na starostno skupino otrok. Pri otrocih do enega leta starosti je najpogostejše bruhanje, medtem ko je pri otrocih starih od enega do štirih let pogostost bruhanja dvakrat večja (Slika 4) (Rockx in sod., 2002).



Slika 4: Prikaz kliničnih znakov in simptomov gastroenteritisa, povzročenega s sapovirusi, glede na starost bolnikov (Rockx in sod., 2002)

Okužba s sapovirusi je običajno povezana s simptomi, ki trajajo v povprečju 6 dni. Driska je najpogostejša v prvih dneh po okužbi s povprečnim trajanjem 5 dni, medtem ko so bruhanje, slabost in povišano telesno temperaturo opazili le v prvih dveh dneh okužbe (Rockx in sod., 2002). Dokaj kratko trajanje kliničnih znakov in simptomov onemogoča realno študijo o primerih izbruha oziroma realnemu številu bolnikov z okužbo s sapovirusi, saj verjetno veliko oseb ne poišče zdravniške pomoči v času bolezni (Johnsen in sod., 2009).

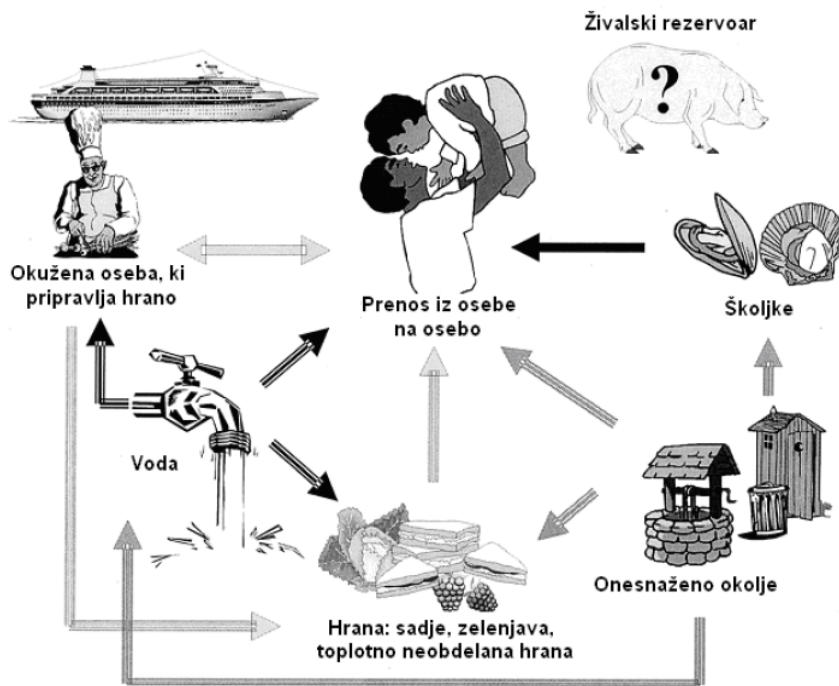
Klinična slika bolezni se v primerjavi z norovirusi razlikuje. Razlike se odražajo predvsem v milejši obliki okužbe s sapovirusi, za katero veljajo pretežno driska kot glavni klinični znak, medtem ko je okužba z norovirusi znana kot »zimsko bolezen bruhanja« pri otrocih. Klinični znaki in simptomi naj bi se pojavljali manj pogosto in naj bi trajali manj časa kot pri okužbi z norovirusi. Zato je okužba s sapovirusi glede na resnost bolezni uvrščena nižje na t.i. *severity score* lestvici, katera vsebuje 20 točk. Okužba s sapovirusi je opredeljena s šestimi točkami, norovirusna z osmimi in rotavirusna okužba z desetimi točkami (Pang in sod., 2000).

2.4.4 Vir okužbe in prenos

Ti virusi ne vsebujejo ovojnice, zato so odporni na kislino in brez težav preidejo preko gostiteljeve želodčne kisline v prebavni trakt, kjer povzročijo okužbo (Green in sod., 2001). Ta morfološka značilnost pa jim omogoča, da preživijo zunaj svojega gostitelja dolgo časovno obdobje (Johnsen in sod., 2009).

Izbruhi so posledica prenosa virusa po fekalno-oralni poti (Chan in sod., 2006), s človeka na človeka ter zaužitja z virusi onesnažene hrane in vode (Usuku in sod., 2008). Sapoviruse so odkrili v rečni vodi, kot posledico fekalne kontaminacije človeka in v odpadnih vodah (Hansman in sod., 2007b). Vir okužb so lahko tudi školjke, ki vodo filtrirajo in tako viruse koncentrirajo (Hansman in sod., 2007c).

Mnoge študije, opravljene na področju živalskih sapovirusov drugod v Evropi kot tudi v Sloveniji, niso poročale o človeških sapovirusih (Reuter in sod., 2010). Pri prašičih so ugotovili zelo veliko različnih sevov sapovirusov, kar nakazuje na možen prenos virusa s človeka na žival. Do tega bi lahko prišlo na živalskih farmah, kjer sta oba gostitelja virusa v neposredni bližini. Zato so potrebne nadaljne študije, v katerih bi istočasno zbrali vzorce tako živali kot tudi kmetijskih delavcev (Zimšek-Mijovski in sod., 2010).



Slika 5: Poti prenosa in kontaminacije s sapovirusi (Moreno-Espinosa in sod., 2004)

2.4.5 Epidemiologija

Okužba s sapovirusi prizadene osebe vseh starostnih skupin, najpogosteje otroke do 5. leta starosti, ne glede na spol (Johnsen in sod., 2009). Izbruhi so običajno v večjih skupnostih, kot so vrtci, šole, domovi za starejše (Johansson in sod., 2005), med vojaškimi rekruti (Phan in sod., 2004), v zdravstvenih ustanovah (Yan in sod., 2005) in na turističnih križarkah (Farkas in sod., 2004). Izbruhi virusnega gastroenteritisa se pojavljajo po vsem svetu. Obolevnost ljudi za okužbo, povzročeno s človeškimi sapovirusi, se razlikuje od države do države in je v povprečju od 5 do 10% (Johnsen in sod., 2009).

Pojavnost virusa ni odvisna od letnega časa, čeprav opažajo povečano število bolnikov v zimskih (Johnsen in sod., 2009; Yan in sod., 2003) in spomladanskih mesecih od marca do maja (Pang in sod., 2000).

Različne opravljene študije po letu 2007 so potrdile visoko podobnost sevov sapovirusov na geografsko širokem območju, od Nizozemske, Švedske, Slovenije, pa vse do Rusije,

Tajvana in Japonske, kar namiguje na skupno mesto izvora in dokaj hitro širjenje virusa po vsem svetu (Svraka in sod., 2010).

2.4.6 Dignostika

Tipsko vrsto človeških sapovirusov, virus Sapporo, so prvič identificirali v vzorcu iztrebka z metodo elektronske mikroskopije (EM) v izbruhu leta 1977 na Japonskem (Chiba in sod., 2000). Za detekcijo je potrebno vsaj od 10^5 do 10^6 virusnih delcev/ml. Metoda omogoča morfološko prepoznavo virusov do rodu (Rabenau in sod., 2003). Če so vzorci večkrat zamrznjeni pogosto morfološka razpoznavna ni mogoča.

Občutljivost EM povečamo od 10- do 100-krat z uporabo imunske elektronske mikroskopije. Če so protitelesa v presežku, postanejo virusi nejasni (Parashar in sod., 2001).

Z encimskoimunsko metodo (ELISA) določamo antigene sapovirusov v iztrebkih. Ta test zazna virusne antigene, če je koncentracija v vzorcu od 10^4 do 10^6 virusov/ml (Parashar in sod., 2001). Izkazalo se je, da ne zazna nekaterih človeških kalicivirusov, čeprav so bili vidni v EM (Cubitt, 1989). ELISA za določanje antigenov sapovirusov še ni dostopna na tržišču.

Najbolj razširjena metoda za detekcijo sapovirusov je verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR), saj ima visoko občutljivost in možnost uporabe za nadaljnje genetske analize. Uporablja se tudi metoda ugnezdene RT-PCR (ang.: Nested RT-PCR). RT-PCR v realnem času je visoko občutljiva, hitra, zmanjša možnost kontaminacij in jo lahko uporabimo za kvantitativne analize (Oka in sod., 2006; Pang in sod., 2009). Prvo poročilo o razvoju te metode za detekcijo sapovirusov je opisal Vinjé s sodelavci leta 2000 (Vinjé in sod., 2000). S kvantitativno analizo so dokazali že 10 kopij virusne cDNA na reakcijo (Chan in sod., 2006; Espy in sod., 2006).

2.4.6.1 Princip delovanja RT-PCR v realnem času

Princip delovanja metode se od konvencionalnega PCR razlikuje v tem, da pomnoževanje lahko spremljamo med samim potekom reakcije.

Ker imajo sapovirusi RNA molekulo, je pred pričetkom PCR reakcije potrebno izvesti reverzno transkripcijo z encimom reverzna transkriptaza. Uspešnost metode je odvisna od izbire tega encima, saj prepíše virusno RNA v komplementarno verigo DNA (cDNA). Tu pa imamo možnost izbire enostopenjske ali dvostopenjske reakcije PCR. Pri dvostopenjski reakciji nastalo cDNA po reverzni transkripciji prenesemo v novo reakcijsko epruveto, kjer nadaljujemo metodo, medtem ko se celotna PCR reakcija pri enostopenjskem procesu odvija v eni epruveti. S slednjim načinom se zmanjša možnost kontaminacije (Real-time PCR: From theory to practice, Invitrogen 2008).

Po reverzni transkripciji, ki se odvija pri ustrezni temperaturi in času odvisno od izbora encima, poteče še dodaten proces pri 95 °C. Ta temperatura deaktivira reverzno transkriptazo in aktivira temperaturno obstojno *Taq* DNA polimerazo. Polimeraza prepíše nastalo cDNA v dvovijačno DNA, in PCR reakcija se nato nadaljuje s tremi osnovnimi procesi:

- denaturacija,
- prileganje,
- podaljševanje.

Denaturacija dvovijačne cDNA navadno poteka pri temperaturi 95 °C in traja v odvisnosti od vsebnosti baznih parov GC virusne RNA. Višja ko je vsebnost, dalj časa poteka denaturacija dvovijačnice. Za pomnoževanje zelenega odseka znotraj virusnega genoma uporabimo par začetnih oligonukleotidov. Za določanje človeških sapovirusov raziskovalci izbirajo tarčno zaporedje znotraj polimeraznega gena genoma sapovirusov oz. v ORF1, kjer je spoj polimeraznega gena s kapsidnim. Ta del genoma je najbolj ohranjen in z izbranimi pari začetnih oligonukleotidov tako zajamejo človeške sapoviruse vseh genskih skupin (GGI, GGII, GGIV in GGV) (Chan in sod., 2006).

En izmed začetnih oligonukleotidov nalega v smeri 5' proti 3' koncu molekule cDNA (ang.: Forward primer), drugi pa v obratni smeri (ang.: Reverse primer). Prileganje se vrši 5 °C nižje od izračunane temperature tališča (T_m) začetnega oligonukleotida in nato sledi podaljševanje verige s pomočjo encima *Taq* DNA polimeraza, katere optimalno delovanje je pri približni temperaturi 71 °C. Če je pridelek PCR reakcije kratek oz. je kratek želeni pomnoženi odsek znotraj virusnega genoma, potem sta procesa prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanje združena s skupno reakcijsko temperaturo 60 °C. Navadno reakcija teče od 40 do 45 pomnoževalnih ciklov, odvisno od sposobnosti polimeraze. Uspešna izvedba te metode je odvisna od prave izbire tega encima (Real-time PCR: From theory to practice, Invitrogen 2008).

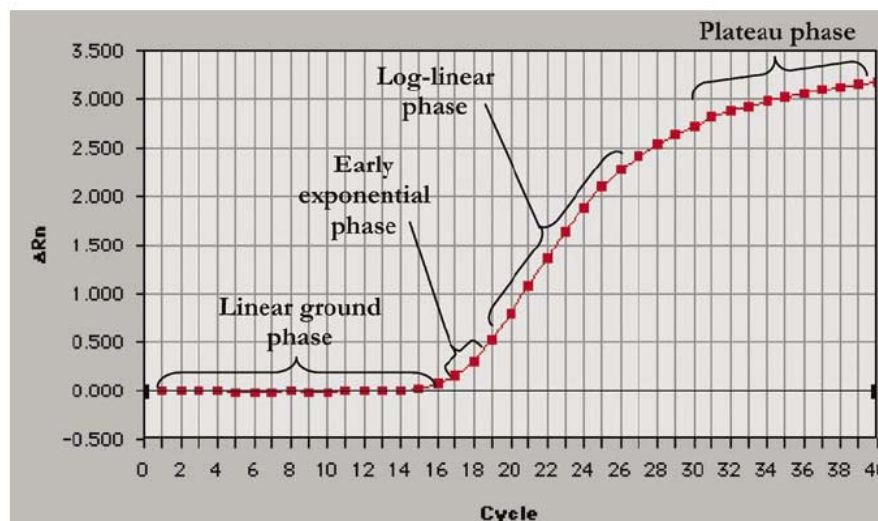
RT-PCR v realnem času pa nam omogoči spremljanje poteka reakcije preko računalniške programske opreme. V ta namen uporabljamo specifično oligonukleotidno sondo. Izbiramo lahko med različno pripravljenimi, kot so: *TaqMan* sonde, molekularni oddajniki (ang.: Molecular beacons), hibridizacijske sonde FRET (ang.: Fluorescence resonance energy transfer), hidrolizirajoče sonde idr. Pravilna izbira je odvisna od načina zaznavanja PCR pridelkov. Najpogosteje uporabljene so *TaqMan* sonde (Wong in Medrano, 2005).

- TaqMan sonda

Sondo predstavlja kratko oligonukleotidno zaporedje DNA, ki ima na 5' koncu vezano fluorescentno barvilo ali fluorofor, na 3' koncu pa dušilno barvilo ali t.i. dušilec (ang.: Quencher). Da barvili povzročita nastanek svetlobnega signala, se morata zgoditi dva procesa. V prvem se mora sonda vezati na tarčno komplementarno zaporedje DNA pri 60 °C. V drugem pa mora *Taq* DNA polimeraza s svojo 5' nukleazno aktivnostjo pri isti temperaturi razrezati 5' konec sonde. S tem se fluorofor loči od dušilca in se kopiči iz cikla v cikel, s čimer se povečuje signal oz. fluorescenca. Več kot je tarčnega zaporedja, večja bo fluorescenca (Espy in sod., 2006).

Pozitiven rezultat zaznamo z značilno PCR krivuljo, ki jo lahko razdelimo v štiri faze (Slika 6). V prvi t.i. linearni fazi (navadno prvih 10 do 15 ciklov) detektor ne zazna signala oz. oddajanje fluorescence ne presega ozadja, saj je količina nastalega pridelka nižja od meje detekcije (ang.: Threshold). V tem trenutku je izračunana t.i. *baseline*, ki se nanaša na

raven signala v prvih 15 ciklih, ko se le-ta ne spreminja. Ko signal doseže mejo detekcije in jo prekorači, prične krivulja z zgodnjo eksponentno fazo. Cikel v katerem se to zgodi, ga označimo kot C_t . Ta vrednost predstavlja reprezentativen podatek o začetnem številu kopij DNA. Tej fazi sledi log-linearna, v kateri reakcija doseže optimum pomnoževanja. Takrat se količina PCR pridelka podvoji z vsakim ciklom v idealnih reakcijskih pogojih. Po določenem času, ko reagenti pomnoževanja postanejo omejeni in jakost fluorescence ni več uporabna za izračun podatkov, reakcija doseže fazo platoja (Wong in Medrano, 2005). R_n označuje jakost fluorescence zbranih fluoroforov deljena s pasivnim barvilom (navadno ROX), ki je dodan v reakcijski pufer z namenom normalizirati fluorescenčni signal fluorofora in korigirati frekvenco valovanja, ki je ne povzroča PCR reakcija (Real-time PCR: From theory to practice, Invitrogen 2008).



Slika 6: Izris grafa metode RT-PCR v realnem času, ki ga spremljamo preko računalniške prigranske opreme (Wong in Medrano, 2005).

2.4.7 Zdravljenje in preprečevanje okužb

Specifičnega zdravljenja okužb s sapovirusi ni in je zgolj simptomatsko (Glass in sod., 2000). V hujših primerih je potrebno dodajanje oralne rehidracijske raztopine, redkeje je potrebna infuzija le te. Protivirusnega zdravila za zdravljenje okužbe s sapovirusi ni (Atmar in Estes, 2002). Pang s sodelavci (2001) je ugotovil pozitiven vpliv rotavirusnega

cepiva pri bolnikih z okužbo s sapovirusi. Sam mehanizem delovanja še ni jasen. Znano je le, da skrajša čas trajanja in pogostost nastanka kliničnih znakov in simptomov.

Preprečevanje nastanka okužbe poteka v smislu omejitve širjenja virusa. V bolnišnicah so v ta namen določene prepovedi za medicinsko osebje in ukrepi čiščenja površin z ustreznim učinkovitim razkužilom (Glass in sod., 2000). Najtežje preprečimo prenos okužbe s človeka na človeka, zato je pomembno pogosto temeljito umivanje rok. Priporočena je uporaba maske za osebe, ki so v stiku z iztrebkom ali izbruhanino bolnikov. Veliko tveganje za okužbo predstavljajo tudi pripravljalci hrane, ki so brez kliničnih znakov okužbe. Zato je potrebno dosledno upoštevanje osebne higiene in HACCP (ang.: Hazard Analysis and Critical Control Points) načel (Parashar in sod., 2001).

V primeru okužene pitne ali rekreacijske vode priporočajo kloriranje visoke stopnje, in sicer 10ppm ali 10mg/l za več kot 30 minut, čeprav tudi ta metoda ni popolnoma učinkovita (Parashar in sod., 2001).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

V raziskavo smo vključili 232 vzorcev iztrebkov, ki so jih sprejeli v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani z različnih klinik Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in drugih zdravstvenih ustanov po Sloveniji s sumom na virusni gastroenteritis. Vzorce smo izbrali iz obdobja od oktobra do decembra 2008 (208 vzorcev) in oktobra 2009 (24 vzorcev).

Vse vzorce so predhodno testirali na noroviruse, enterične adenoviruse, rotaviruse ter astroviruse.

3.1.2 Komerčni komplet za osamitev virusne RNA (iPrep[™] Virus kit, Invitrogen)

- Aparat iPrep[™]
- Programska kartica iPrep[™] Card: Viral DNA/RNA
- iPrep[™] nosilna stojala
- iPrep[™] elucijske epruvetke (1,5ml)
- iPrep[™] epruvetke za obdelavo vzorca (2ml)
- iPrep[™] držala za nastavke in iPrep[™] nastavki
- iPrep[™]PureLink[™] kartuše

3.1.2.1 Reagenti v iPrep[™]PureLink[™] kartuši

- Razgradnji pufer (vdolbinica 1)
- Proteinaza K (20mg/ml) v hranitvenem pufu (vdolbinica 2)
- Elucijski pufer (DEPC voda) (vdolbinica 3)
- Pufer za čiščenje 2 (vdolbinici 5 in 6)
- Pufer za čiščenje 1 (vdolbinica 7)

- Dynabeads[®]MyOne[™]SILANE (4,8mg/ml magnetnih delcev v hranitvenem pufru) (vdolbinica 8)
- Pufer za izpiranje (vdolbinica 9)
- Izopropanol (vdolbinica 10)

3.1.3 Reagenti za pomnoževanje virusne RNA z RT-PCR v realnem času

3.1.3.1 Začetna oligonukleotida in oligonukleotidna sonda (Preglednica 1)

- SV-F (Applied Biosystems)
- SV-R (Applied Biosystems)
- SV-P (Metabion)

Preglednica 1: Podatki o začetnih oligonukleotidih in oligonukleotidni sondi

	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Mesto naleganja (nt)	Vir
SV-F	GAY CWG GCY CTC GCC ACC T	5078-5096 ¹	Svraka in sod., 2009
SV-R	GCC CTC CAT YTC AAA CAC TA	5182-5163 ²	
SV-P ³	FAM - AGA CCT TTC GGT ACT TCG TCC ACA AAC ACA A - BHQ		SOP-P EMI-17

^{1,2} Mesto naleganja je glede na sev genske skupine II Mc 10 (GenBank Acc No. AY237420)

³ Oligonukleotidna sonda je označena na 5' koncu z fluoroforom 6-karboksifluorescin teksas rdeče (FAM), ki oddaja svetlobo pri 610 nm ter na 3' koncu z dušilcem BHQ (ang.: Black hole quencher)

3.1.3.2 Testni komplet AgPath-ID[™] One-Step RT-PCR Kit za pomnoževanje virusne RNA (Ambion)

- Voda, prosta nukleaz
- 2x RT-PCR pufer
- 25x RT-PCR encimska mešanica

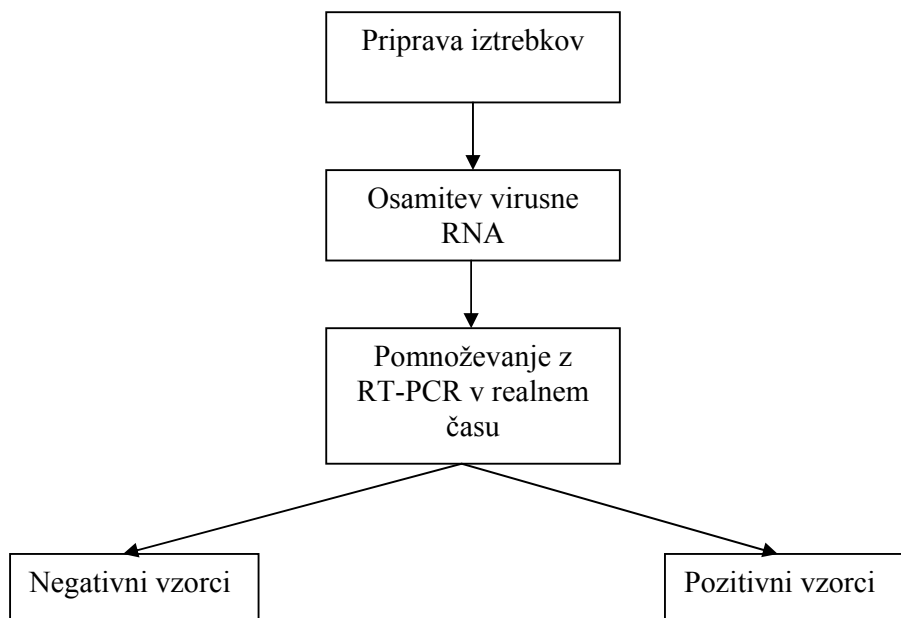
3.1.4 Laboratorijska oprema

- Sterilne plastične epruvete (10 ml)

- Sterilne plastične pipete (1,5 ml)
- Staničevina
- Stojalo za epruvete (Eppendorf)
- Sterilne epruvetke (velikosti 1,5ml in 0,5ml) (Eppendorf)
- PCR hladilno stojalo (Eppendorf)
- Sterilna reagenčna ploščica za 48 vzorcev s folijo (Eppendorf)
- Stojalo za epruvetke (Eppendorf)
- Komora za varno delo (PIO SMBC 122)
- Brezprašna komora za varno delo (Iskra PIO Lfv9)
- Hlajena namizna centrifuga (Eppendorf 5415R)
- Vibracijsko mešalo (Bio Vortex V1, Biosan)
- Avtomatske pipete (0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l) (Eppendorf)
- Sterilni nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- Zaščitne rokavice brez smukca (Safeskin)
- Aparat za osamitev virusne DNA/RNA iPrepTM (Invitrogen)
- Aparat za izvedbo RT-PCR v realnem času StepOneTM (Applied Biosystems)
- Programska oprema StepOneTM

3.2 METODE

3.2.1 Shema analize



Slika 7: Shema poteka analize

3.2.2 Priprava iztrebkov

Približno 1 gram iztrebka smo suspendirali v 1,5 ml fosfatnega pufru in premešali na vibracijskem mešalu. Tako dobljeno 10% suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1600g. Supernatant smo uporabili za nadaljnje analize in ga shranili v hladilniku pri +4 °C ali v zamrzovalni skrinji pri -70 °C.

3.2.3 Osamitev virusne RNA (iPrep™ virus kit, Invitrogen)

Delo je potekalo pri sobni temperaturi. V mikrobiološki komori smo odpipetirali 230µl supernatanta v sterilno epruvetko in centrifugirali 5 minut pri maksimalni hitrosti (16000g). V aparat za osamitev nukleinskih kislin iPrep™ smo vstavili programsko kartico. Obe stojali iz aparata smo prestavili v mikrobiološko komoro in v stojalo za kartuše vstavili za vsak vzorec po eno. V vdolbinico zadnjega dela kartuše smo vstavili

epruvelko brez pokrovčka za obdelavo vzorca. Drugo stojalo smo napolnili kot sledi: v prvo vrsto, označeno z E, smo vstavili prazne odprte elucijske epruvelke in poleg postavili pokrovčke. V tretjo vrsto, označeno s T2, smo vstavili držala za nastavke in nastavke. V zadnjo vrsto, označeno s S, smo vstavili epruvelko brez pokrovčka z 205µl vzorca. Na aparatu smo zaprli vrata in nastavili ustrezen program. Po končanem postopku smo osamljeno RNA v epruvelki uporabili za nadaljnje analize in jo shranili v hladilniku pri +4 °C ali v zamrzovalni skrinji pri -70 °C. Uporabljene nastavke, kartuše in epruvelke smo zavržli v rumen zabojnik za biološko nevarne odpadke.

3.2.4 Izvedba RT-PCR v realnem času

Pomnoževanje virusne RNA smo izvedli na aparatu StepOne™. Celotna priprava reakcijske mešanice poteka v komori, ki je namenjena le za to delo. Reakcijsko mešanico smo pripravili v sterilni 1,5 ml veliki epruvelki. Uporabili smo ustrezen par začetnih oligonukleotidov in oligonukleotidno sondo (Preglednica 1) ter reagente testnega kompleta AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Ambion). Za eno reakcijo smo pripravili 2 µl virusne RNA in 8 µl reakcijske mešanice, pripravljene iz:

- 1,35 µl vode, proste nukleaz
- 5,00 µl 2x RT-PCR pufra
- 0,50 µl začetnega oligonukleotida SV-F (10 µM)
- 0,50 µl začetnega oligonukleotida SV-R (10 µM)
- 0,25 µl oligonukleotidne sonde SV-P (10 µM)
- 0,40 µl 25x RT-PCR encimske mešanice

Vse reagente smo pred pipetiranjem dobro premešali ter pred dodatkom 25x mešanice encimov kratko centrifugirali. Reakcijsko mešanico smo hitro razdelili v reagenčno ploščico (ang.: strip), in jo postavili v ohlajeno stojalo. Barva stojala se ob temperaturi >7 °C spremeni iz vijolične v roza. V vsako vdolbinico smo odpipetirali po 8µl reakcijske mešanice. V drugi brezprašni komori smo dodali 2µl osamljene virusne RNA. Pred dodatkom virusne RNA, smo epruvelko premešali na vibracijskem mešalu in pazili na magnetke na dnu. Reagenčno ploščico smo dobro zatesnili s folijo in jo pred vstavitvijo v aparat StepOne™ na hitro centrifugirali, da smo zbrali vso tekočino na dno vdolbinic.

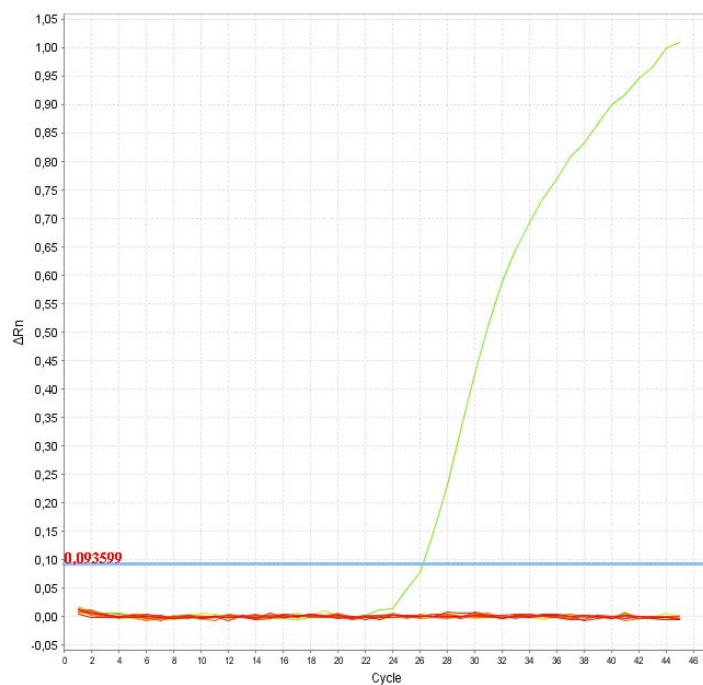
Vključili smo aparat StepOne™ in programsko opremo StepOne™. Pred pripravo reakcijske mešanice smo v program vnesli ustrezen protokol. Reagenčno ploščico smo vstavili v aparat in potrdili pričetek ustreznega programa (Preglednica 2). Potek reakcije smo lahko spremljali preko računalnika.

Preglednica 2: Prikaz stopenj reakcije RT-PCR v realnem času

Proces	Čas trajanja	Temperatura	Število ciklov
Reverzna transkripcija	10 minut	45 °C	1 cikel
Prekinitev delovanja reverzne transkriptaze in aktivacija <i>Taq</i> DNA-polimeraze	10 minut	95 °C	1 cikel
Denaturacija dvovijačne cDNA	15 sekund	95 °C	45 ciklov
Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige	45 sekund	56 °C	

Kot pozitivno kontrolo reakcije RT-PCR smo uporabili RNA sapovirusov predhodnega pozitivnega vzorca ter ga ustrezno redčili (10^{-3}). Kot negativno kontrolo smo uporabili demineralizirano destilirano vodo (ddH₂O).

Po končanem programu smo ploščico z vzorci ustrezno zaščitili in jo zavrgli v rumen zabojnik za biološko nevarne odpadke, vsa stojala smo prebrisali z etanolom ter postavili v brezprašno komoro, ki smo jo prav tako razkužili in vklopili UV svetilko. Pridobljene rezultate smo shranili (Slika 8). Graf prikazuje spremembo jakosti fluorescence (ΔR_n) v odvisnosti od števila ciklov reakcije RT-PCR v realnem času. Zelena krivulja predstavlja pozitivno kontrolo, rdeča krivulja predstavlja negativno kontrolo. Modra premica predstavlja vrednost meje detekcije signala (ang.: *Threshold*).



Slika 8: Grafični prikaz načina spremljanja rezultatov z metodo RT-PCR v realnem času

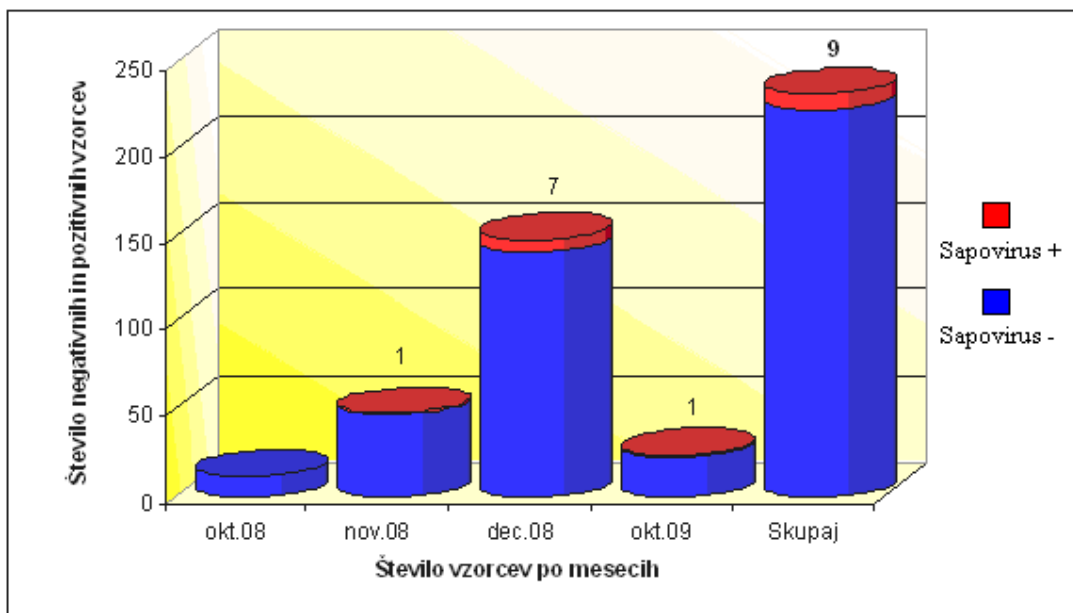
4 REZULTATI

Testirali smo 232 vzorcev iztrebkov, ki so jih sprejeli v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani s sumom na virusno povzročeni akutni gastroenteritis, med oktobrom in decembrom 2008, ter v oktobru 2009. Iz obdobja 2008 smo pregledali skupaj 89,7 % (208/232) vzorcev, iz oktobra leta 2009 pa 10,3 % (24/232). Povprečna starost vzorčne populacije je bila približno 21 let. Najmlajši bolnik je bil star 9 dni, medtem ko najstarejši 86 let. Starost je bila preračunana na dan vzorčenja. Delež žensk v primerjavi z moškimi je bil 49,6 % (115/232) (Preglednica 3).

Preglednica 3: Pregled vseh analiziranih vzorcev glede na leto vzorčenja, spol in rezultat analize

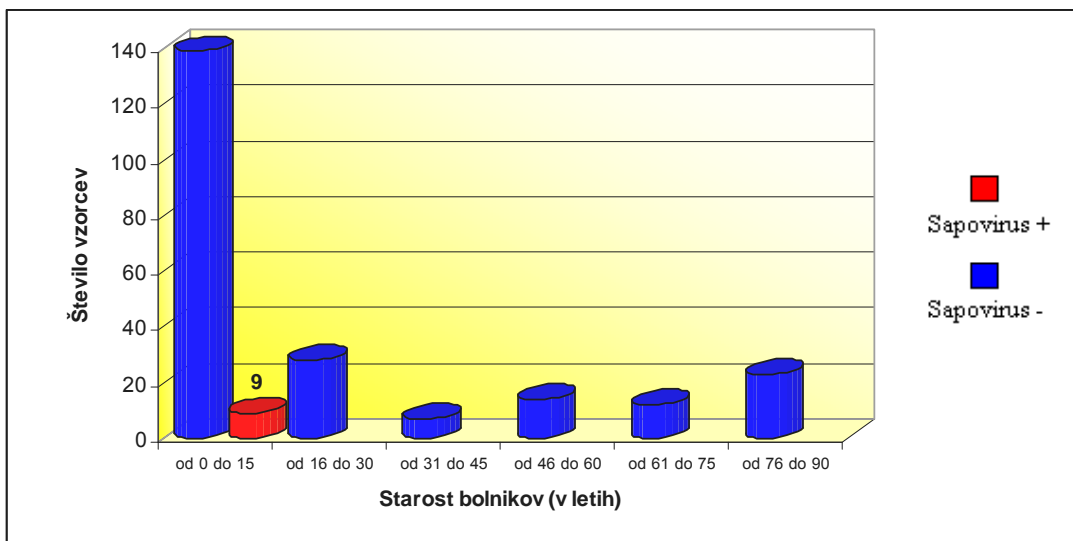
Obdobje	Število vzorcev	Spol	Št. negativnih vzorcev na sapoviruse	Št. pozitivnih vzorcev na sapoviruse	Št. vseh vzorcev	
Okt.-dec. 2008	208	Moški	103	3	106	232
		Ženske	97	5	102	
Okt. 2009	24	Moški	11	0	11	
		Ženske	12	1	13	
			223	9		

Izmed 232 pregledanih vzorcev, je bilo 9 (3,9 %) pozitivnih na sapoviruse. Iz obdobja leta 2008 je bilo pozitivnih vzorcev 3,8 % (8/208), od tega je bilo v novembru 2008 pozitivnih vzorcev 2,1 % (1/48), decembra 2008 4,7 % (7/148) ter oktobra 2009 4,2 % (1/24). Pri 12 pregledanih vzorcih iz oktobra leta 2008 RNA sapovirusov nismo določili (Slika 9).



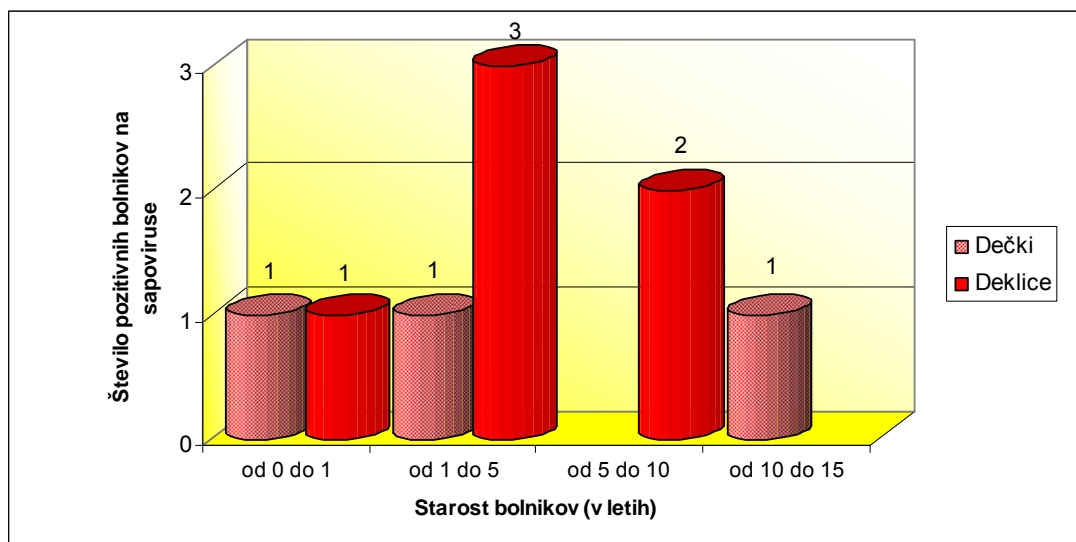
Slika 9: Grafični prikaz števila negativnih in pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na delež le-teh po času vzorčenja

V širih pregledanih mesecih smo RNA sapovirusov določili pri devetih otrocih. Najmlajši je bil star 9 mesecev, najstarejši pa 11 let (Slika 10).



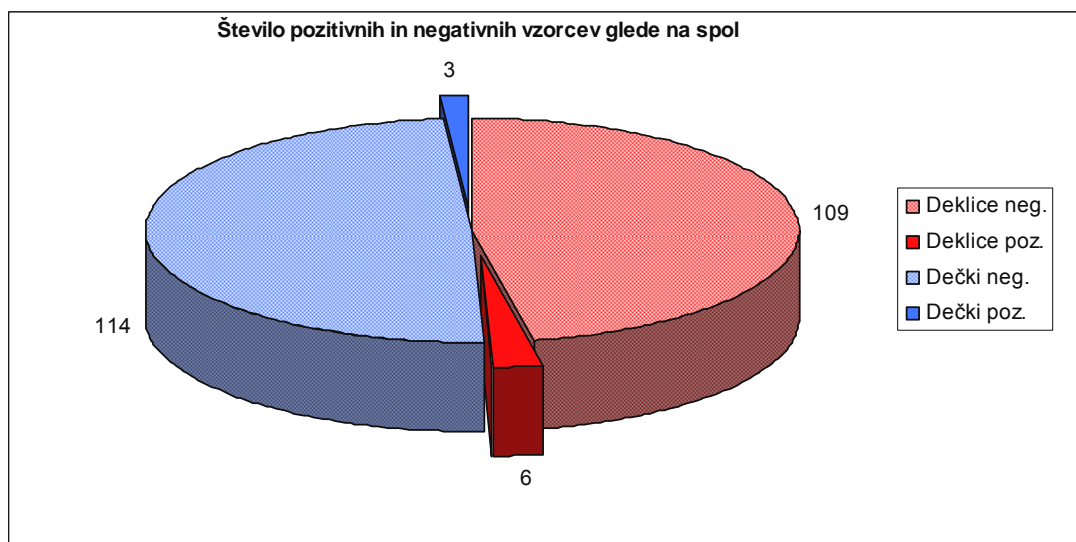
Slika 10: Grafični prikaz števila negativnih in pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na delež le-teh po letih

Kar 66,7% (6/9) je bilo mlajših od 5 let s povprečno starostjo 4,27 let. Od 9 pozitivnih vzorcev je le 33,3% (3/9) dečkov in kar 66,7% (6/9) deklic (Slika 11).



Slika 11: Grafični prikaz pozitivnih bolnikov na sapoviruse glede na starost in spol

Glede na celotno vzorčno populacijo, ki je bila glede na spol razdeljena približno na polovico, je pogostost okužbe med deklicami večja (6/115) kot med dečki (3/117) (Slika 12).



Slika 12: Grafični prikaz negativnih in pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na spol

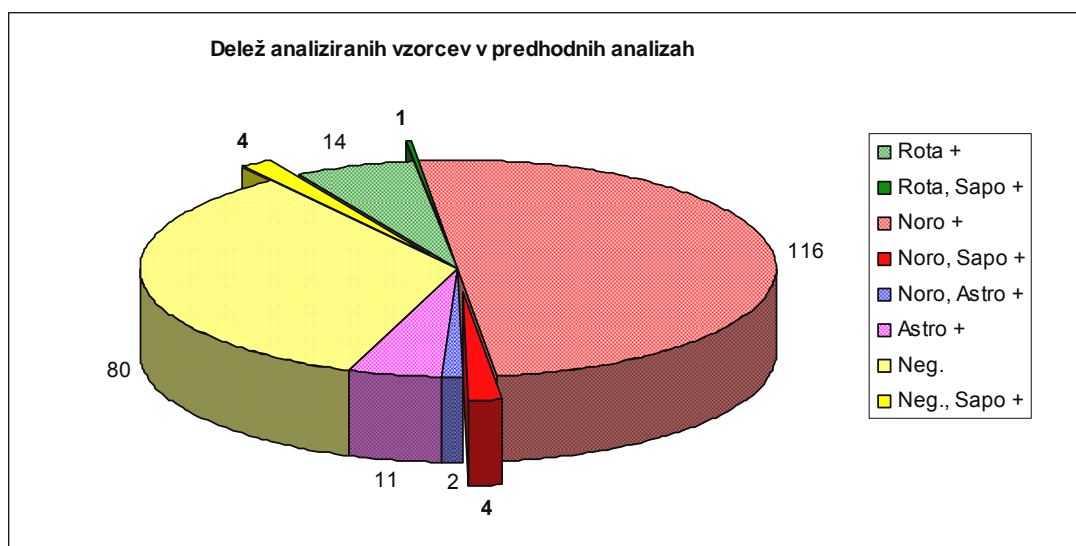
Vse izbrane vzorce v naši analizi so predhodno analizirali na druge povzročitelje virusnega gastroenteritisa, kot so norovirusi, rotavirusi, gastroenterični adenovirusi ter astrovirusi.

Pri 15/232 (6,5 %) so predhodno potrdili rotaviruse (Slika 13), pri 120/232 (51,7 %) noroviruse, pri 11/232 (4,7 %) astroviruse, pri 84/232 (36,2 %) virusnega povzročitelja niso določili. Pri dveh vzorcih - 0,9 % (2/232) - so potrdili tako noroviruse kot tudi astroviruse.

Od 232 vzorcev so pri 148 (63,8%) določili vsaj enega od povzročiteljev virusnega gastroenteritisa, od tega smo v naši analizi potrdili pri petih - 3,4 % (5/148) - tudi sapoviruse.

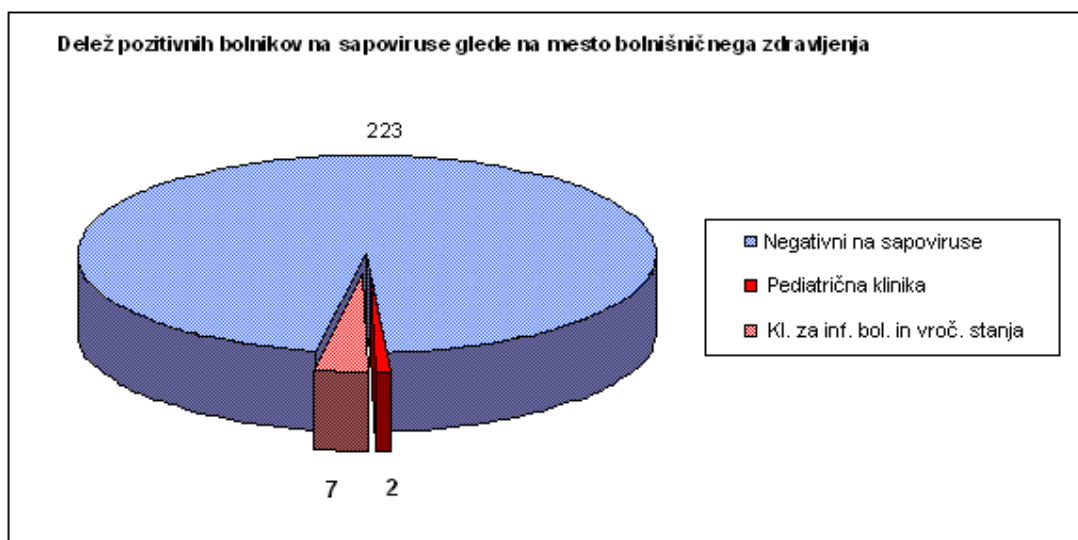
Od vseh pozitivnih na rotaviruse (15 vzorcev) smo poleg le-teh dokazali tudi sapoviruse v enem primeru ter izmed 120 pozitivnih na noroviruse smo v štirih primerih zaznali RNA sapovirusov.

Od 84 predhodno analiziranih negativnih vzorcev smo dodatno v 4,8 % (4/84) določili sapoviruse.



Slika 13: Grafični prikaz deleža pozitivnih vzorcev na sapoviruse glede na predhodne analize. Števila v debelem tisku predstavljajo število vzorcev, ki so bili pozitivni na sapoviruse.

Sedem bolnikov od devetih (77,8 %), pri katerih smo določili sapoviruse, so bili bolnišnično zdravljeni na Kliniki za infektivne bolezni in vročinska stanja UKC Ljubljana in dva (22,2 %) na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana (Slika 14).



Slika 14: Grafični prikaz negativnih in pozitivnih bolnikov na sapoviruse. Slednji so členjeni glede na mesto bolnišničnega zdravljenja.

Preglednica 4: Prikaz pozitivnih bolnikov na sapoviruse, njihovi osebni podatki ter podatki analize.

Bolnik	Sprejem vzorca	Pošiljatelj	Spol	Starost bolnika	Kraj bivanja	Predhodne analize iztrebka ³	$C_{t\text{ saV}}^4$
1.	nov. 2008	Kl. za inf. ¹	M	4 leta	Preserje	Neg.	22,50
2.	dec. 2008	Kl. za inf. ¹	Ž	1 leto	Grosuplje	Rotavirusi	31,83
3.	dec. 2008	Ped. Kl. ²	M	11 let	Ljubljana	Neg.	34,08
4.	dec. 2008	Ped. kl. ²	M	9 mes.	Vodice	Neg.	14,67
5.	dec. 2008	Kl. za inf. ¹	Ž	7 let	Horjul	Norovirusi	34,45
6.	dec. 2008	Kl. za inf. ¹	Ž	4 leta	Hruševje	Norovirusi	37,76
7.	dec. 2008	Kl. za inf. ¹	Ž	9 mes.	Logatec	Norovirusi	35,82
8.	dec. 2008	Kl. za inf. ¹	Ž	9 let	Ljubljana	Norovirusi	39,16
9.	okt. 2009	Kl. za inf. ¹	Ž	1 leto	Vrhnika	Neg.	26,03

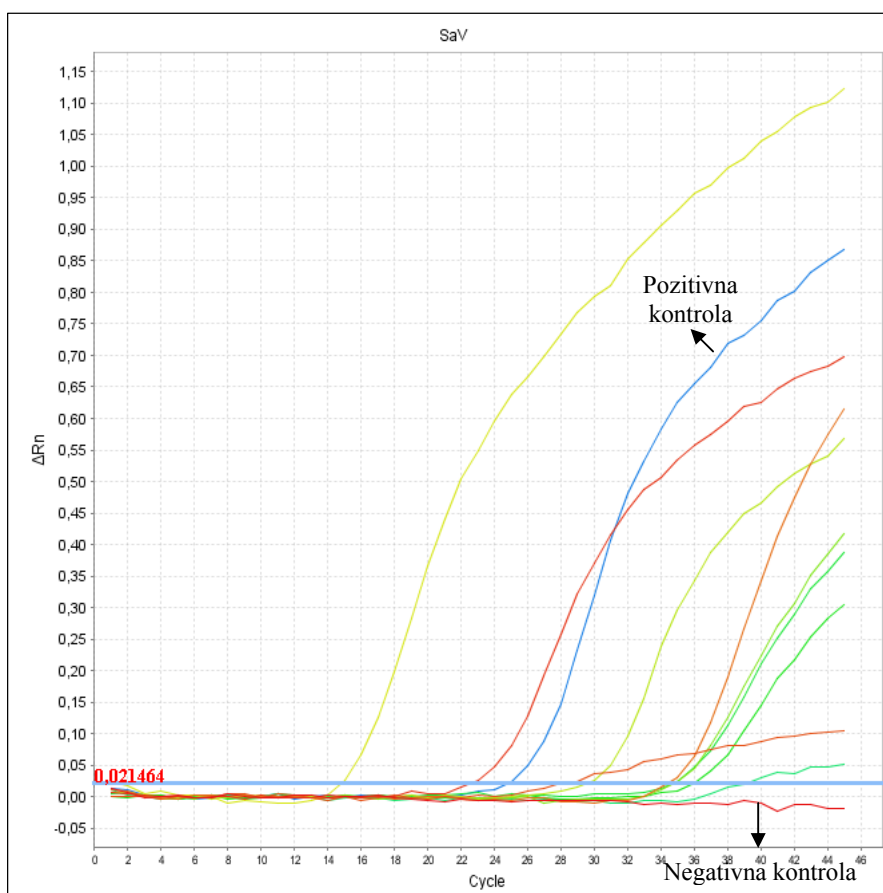
¹ Klinika za infektivne bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana

² Pediatrska klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana

³ Rezultati pridobljeni s testom ELISA

⁴ Vrednost cikla, pri katerem je signal dosegel mejo detekcije

Z metodo RT-PCR v realnem času smo pri vsakem pozitivnem vzorcu določili RNA sapovirusov s PCR krivuljo ter podatkom o številu cikla (C_t), pri katerem fluorescenca kot signal prekorači mejo detekcije (ang.: *Threshold*) (Slika 15). Krivulje so dokaz pozitivnih vzorcev na sapoviruse. Modra premica označuje mejo detekcije signala. Iz grafa lahko razberemo vrednosti C_t , ki so zapisane v preglednici 4.



Slika 15: Prikaz rezultatov analize z metodo RT-PCR v realnem času.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V našo analizo smo vključili 232 vzorcev iztrebkov bolnikov z drisko in/ali bruhanjem. Vzorce so poslali zaradi suma na virusno povzročeni akutni gastroenteritis. Izbrani vzorci so bili iz obdobja od oktobra do novembra leta 2008 ter iz oktobra leta 2009. Zajete so bile vse starostne skupine, s povprečno starostjo vzorčne populacije 20,8 let. Razporeditev glede na spol je bila enakomerna.

Z molekularno metodo RT-PCR v realnem času smo potrdili 9 (3,9 %) pozitivnih bolnikov z okužbo s človeškimi sapovirusi. Pri vseh devetih vzorcih z metodo neposredne elektronske mikroskopije predhodno sapovirusov niso določili.

V primerjavi z ostalimi študijami opravljenimi drugod v Evropi in svetu, smo sapoviruse določili le v 9 primerih, kar je zelo malo. Na Danskem so poročali o 9 % obolevnosti (Johnsen in sod., 2009), na Finskem prav tako 9 % (Pang in sod., 2000), v Angliji 13 % (Iturriza-Gómara in sod., 2008), na Irskem 11 % (Logan in sod., 2007), na Tajskem le 0,8 % (Kittigul in sod., 2009), na Japonskem 4 % (Yan in sod., 2003) ter 3,3 % v Hong Kongu (Chan in sod., 2006).

Vzorci v naši analizi zajemajo le obdobje štirih mesecev. Rezultati bi bili verjetno drugačni, če bi raziskavo izvajali vse leto. Podatki iz Hong Konga o 3,3 % pozitivnih bolnikov na sapoviruse so z našimi primerljivi (Chan in sod., 2006). Uporabili so par začetnih oligonukleotidov, ki nalega na isto mesto tarčnega zaporedja kot v naši analizi, in sicer na spoj polimeraznega in kapsidnega gena. Vse pozitivne primere so tudi genotipizirali in dokazali, da metoda RT-PCR v realnem času v kombinaciji z uporabljenim parom začetnih oligonukleotidov ter sonde, zazna vsaj tri izmed štirih genskih skupin človeških sapovirusov, in sicer GGI, GGII in GGIV. Navzkrižne reaktivnosti z noro- ali rotavirusi niso zaznali, zato se tudi v naši analizi nismo odločili za uporabo drugih začetnih oligonukleotidov pri štirih pozitivnih primerih, ko smo poleg sapovirusov dokazali tudi noroviruse.

Nekateri drugi raziskovalci so uporabili večje število pozitivno usmerjenih začetnih oligonukleotidov in dve oligonukleotidni sondi, da bi zajeli tudi zaporedja nekaterih redkejših sevov genske skupine V. Med 95 vzorci so dokazali sedem primerov okužb s človeškimi sapovirusi. Specifičnost metode je bila 100%, navzkrižne reaktivnosti z noro-, astro-, rota- in adenovirusi niso zaznali (Oka in sod., 2006).

Na sliki 9 (stran 24) lahko vidimo, da je bil največji odstotek obolelih z okužbo s sapovirusi v mesecu decembru leta 2008. Podobne rezultate so dobili na Japonskem, kjer so se okužbe najpogosteje pojavljale novembra, decembra in januarja (Yan in sod., 2003), medtem ko druge študije poročajo o največji pojavnosti virusa v populaciji od marca do maja (Pang in sod., 2000). O značilnem vzorcu pojavljanja virusa ne moremo govoriti, saj bi morali spremljati okužbe s sapovirusi preko vsega leta in več let, čeprav smo zajeli obdobje za katerega je veljalo, da je kroženje virusa v populaciji najpogostejše. Na Danskem so jasen vrh okužb zabeležili v mesecu juliju in decembru, neodvisno od leta vzorčenja. Vzorec pojavljanja okužb s sapovirusi ni tako jasen kot tisti pri norovirusih ali rotavirusih, ki se pojavljata pretežno v zimskih mesecih (Johnsen in sod., 2009).

V raziskavi smo sapoviruse pogosteje določili pri deklicah (5,2% - 6/115) kot pri dečkih (2,6% - 3/117). Glede na to, da je v našem primeru število pozitivnih bolnikov na sapoviruse majhno (9/232), ne moremo zaključiti, da je okužba odvisna od spola in je dovzetnost deklic za okužbo večja.

Testirani vzorci so bili zajeti iz dokaj velike starostne skupine, čeprav je izračunano povprečje vzorčne populacije le 20,8 let. Najmlajši bolnik je bil star devet dni in najstarejši 86 let. Zanimivo je, da smo določili sapoviruse le pri bolnikih starih do 11 let, in sicer je bil najmlajši star 9 mesecev, najstarejši pa 11 let. Izračunana povprečna starost je bila tako 4,27 let. Podobne rezultate so dobili tudi britanski raziskovalci, ki so opisali največjo prevalenco okužb s sapovirusi pri otrocih starih do 5 let (Iturriza-Gómara in sod., 2008). Upoštevati moramo, da marsikdo od starejših bolnikov običajno ne išče medicinske pomoči glede na povprečno kratko trajanje simptomov in kliničnih znakov. V teh primerih bi bilo koristno izvesti anketo po domovih za starostnike.

Vsi pozitivni bolniki na sapoviruse so bili bolnišnično zdravljeni na klinikah Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Primeri okužb s sapovirusi so bili posamični. Kraji stalnega prebivališča so zgoščeni v notranjosti Slovenije, kar pa ne nakazuje na povezanost bolnikov z možnim mestom izbruha virusa. Bolniki so bili različnih starostnih skupin, okužbe so izbruhnile v različnih mesecih, poleg tega ne vemo katera genska skupina je prevladovala pri obolelih, zato ne moremo govoriti o epidemiji.

Pri 63,8 % (148/232) analiziranih vzorcih so predhodno potrdili okužbo z rotavirusi, norovirusi in astrovirusi. Med temi 148 vzorci smo v petih primerih (3,4 %) določili tudi genom sapovirusov, zaradi česar lahko govorimo o mešani oz. dvojni okužbi. V enem primeru smo potrdili dvojno okužbo s sapovirusi in rotavirusi ter v štirih primerih dvojno okužbo s sapovirusi in norovirusi. Raziskovalec Cunliffe s sodelavci je leta 2010 opazil podobno kombinacijo dvojne okužbe kot smo jo potrdili v naši raziskavi. S tem tudi potrjujemo, da krožijo znotraj populacije različni povzročitelji virusnega gastroenteritisa in da so otroci sočasno lahko dovzetni za več različnih virusov. V naši raziskavi je več kot polovica (5/9) primerov okužb s sapovirusi dvojnokokužba.

V Sloveniji se pri bolnikih z virusnim gastroenteritisom rutinsko ne izvaja diagnostika okužb s sapovirusi. Pomemben je podatek, da smo v preiskovanem obdobju med 84 bolniki, kjer virusov predhodno niso določili, dodatno dokazali samostojno okužbo s sapovirusi v 4,8% (4/84).

Z uporabljenim metodo RT-PCR v realnem času smo pridobili podatke o C_t vrednostih, ki jih lahko razberemo iz preglednice 4 (stran 27). Pri večini je prišlo do detekcije signala dokaj pozno, po 30. ciklu. Posledično lahko sklepamo, da je bila koncentracija virusov v vzorcu nizka. Razlog tega je lahko, da so bili vzorci odvzeti šele v fazi prebolevanja, ko koncentracija virusa upade.

Le pri dveh bolnikih smo ugotovili izstopajoče podatke, in sicer bolnik št. 1 in bolnik št. 4. Prvi je imel C_t pri 22, drugi pa pri 14. ciklu. S tem lahko potrdimo, da je bil bolnikoma vzorec odvzet v akutni fazi okužbe, ko je v vzorcu prisotna visoka koncentracija virusa.

Pri metodi RT-PCR v realnem času smo izbrali začetne oligonukleotide (Svraka in sod., 2009), ki nalegajo na visoko ohranjen del genoma sapovirusov, s čimer smo predvideli, da bomo zaznali sapoviruse vseh genskih skupin. Glede na predhodne študije drugih raziskovalcev, bi morali uporabiti večje število začetnih oligonukleotidov in dve sondi (Oka in sod., 2006) ter vse sapovirus pozitivne vzorce na koncu tudi genotipizirati. Ker genska skupina I prevladuje po vsem svetu in verjetno tudi v Sloveniji, zato menimo, da je odstotek obolelih glede na naše poskusne pogoje realen.

5.2 SKLEPI

Z analizo 232 iztrebkov bolnikov, smo v 9 primerih zaznali genom sapovirusov. Čeprav je prisotnost virusa v populaciji nizka (3,9%), je rezultat primerljiv s podatki o okužbah s sapovirusi drugod v Evropi in po svetu.

Vsi bolniki, pozitivni na sapoviruse, so bili otroci, bolnišnično zdravljeni na klinikah Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Največ obolelih je bilo iz starostne skupine od 1 do 5 let, kar kaže na to, da so predšolski otroci najbolj dovzetna starostna skupina za okužbo s sapovirusi.

V naši študiji smo dokazali RNA sapovirusov dvakrat pogosteje pri deklicah kot pri dečkih, čeprav je bila porazdelitev po spolu enakomerna.

Okužba s sapovirusi v 55,6 % predstavlja dvojno okužbo ob rotavirusih ter norovirusih.

Jasnega vzorca pojavljanja virusa v populaciji nismo zaznali, saj smo zajeli zgolj tri jesensko-zimske mesece, za katere so sicer nekatere študije dokazale večjo pojavnost sapovirusov.

V raziskavi smo zajeli tudi tiste vzorce, pri katerih predhodno niso dokazali povzročitelja virusnega gastroenteritisa. V 4,8 % smo potrdili okužbo s sapovirusi.

6 POVZETEK

V izbranem poskusnem obdobju smo testirali 232 vzorcev iztrebkov bolnikov, katere so prejeli v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, zaradi suma na virusno povzročeni gastroenteritis. Pri nekaterih med njimi so predhodno potrdili vsaj enega povzročitelja.

Po pripravi vzorcev iztrebkov, smo osamili virusno RNA s komercialnim kompletom iPrep™ (Invitrogen). Po končanem avtomatiziranem postopku smo vzorce analizirali z metodo RT-PCR v realnem času. Uporabili smo reagente kompleta AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Ambion). Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov, ki je nalegal na visoko ohranjen del genoma sapovirusov, to je na spoj med polimeraznim in kapsidnim genom v ORF1. Za zaznavanje PCR pridelkov smo uporabili *TaqMan* sondo.

RNA sapovirusov smo dokazali v 9 vzorcih (3,9 %). Vseh 9 pozitivnih primerov so bili otroci, stari do 11 let. Vsi so bili bolnišnično zdravljeni na Pediatrični kliniki in Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Pri deklicah smo genom sapovirusov dokazali dvakrat pogosteje kot pri dečkih. Največje število okuženih s sapovirusi smo zaznali decembra 2008.

Pri petih primerih (55,6 %) smo dokazali mešano oz. dvojno okužbo s sapovirusov ob rotavirusih in norovirusih, medtem ko so bili štirje primeri s samostojno okužbo s sapovirusi.

7 VIRI

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

Atmar R.L., Estes M.K. 2002. Norwalk virus and related caliciviruses causing gastroenteritis. V: *Clinical virology*. Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G. (eds.). Washington, ASM Press: 1041-1060

Chan M.C.W., Sung J.J.Y., Lam R.K.Y., Chan P.K.S., Lai R.W.M., Leung W.K. 2006. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. *Journal of Virological Methods*, 134: 146-153

Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., Honma S. 2000. Sapporo virus: History and recent findings. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 303-308

Clarke I.N., Lambden P.R. 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 309-316

Cubitt W.D. 1989. Diagnosis, occurrence and clinical significance of the human 'candidate' caliciviruses. *Progress in Medical Virology*, 36: 103-119

Cunliffe N.A., Booth J.A., Elliot C., Lowe S.J., Sopwith W., Kitchin N., Nakagomi O., Nakagomi T., Hart C.A., Regan M. 2010. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in a large pediatric hospital, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 55-62

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

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

Fullerton S.W.B., Blaschke M., Coutard B., Julia G., Gorbalenya A., Canard B., Tucker P.A., Rohayem J. 2007. Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*, 81: 1858-1871

Glass R.I., Noel J., Ando T., Fankhauser R., Belliot G., Mounts A., Parashar U.D., Bresse J.S., Monroe S.S. 2000. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *Journal of Infectious Diseases*, 2: 254-261

Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., Berke T., Clarke I.N., Estes M.K., Matson D.O., Nakata S., Neill J.D., Studdert M.J., Thiel H.-J. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 322-330

Green K.Y., Chanock R.M., Kapikian A.Z. 2001. Human caliciviruses. V: *Fields' virology*. 4th ed. Knipe D.M., Howely P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 841-874

Hansman G.S., Oka T., Sakon N., Takeda N. 2007a. Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1519-1525

Hansman G.S., Sano D., Ueki Y., Imai T., Oka T., Katayama K., Takeda N., Omura T. 2007b. Sapovirus in water, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 133-135

Hansman G.S., Oka T., Okamoto R., Nishida T., Toda S., Noda M., Sano D., Ueki Y., Imai T., Omura T., Nishio O., Kimura H., Takeda N. 2007c. Human sapovirus in clams, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 620-622

Invitrogen. 2008. Real-time PCR: From theory to practice Carlsbad, Invitrogen Corporation:1-70

Iturriza-Gómara M., Elliot A.J., Dockery C., Fleming D.M., Gray J.J. 2008. Structured surveillance of infectious intestinal disease in pre-school children in the community: »The Nappy Study«. *Epidemiology and Infection*, 19: 1-10

Johansson P.J.H., Bergentoft K., Larsson P.A., Magnusson G., Widell A., Thorhagen M., Hedlund K.-O. 2005. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37: 200-204

Johnsen C.K., Midgley S., Böttiger Blenda. 2009. Genetic diversity of sapovirus infections in Danish children 2005-2007. *Journal of Clinical Virology*, 46: 265-269

Kittigul L., Pombubpa K., Taweekate Y., Yeephoo T., Khamrin P., Ushijima H. 2009. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapoviruses and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Journal of Medical Virology*, 81: 345-353

Logan C., O'Leary J., O'Sullivan N. 2007. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, 146: 36-44

Matson D.O., Szücs G. 2003. Calicivirus infections in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16: 241-246

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

Nakata S., Honma S., Numata K.-K., Kogawa K., Ukae S., Morita Y., Adachi N., Chiba S. 2000. Members of the family *Caliciviridae* (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 2029-32

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

Oka T., Katayama K., Hansman G.S., Kageyama T., Ogawa S., Wu F.-T., White P.A., Takeda N. 2006. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 78: 1347-1353

Okada M., Yamashita Y., Oseto M., Shinozaki K. 2006. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Archives of Virology*, 151: 2503-2509

Pang X.L., Honma S., Nakata S., Vesikari T. 2000. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 288-294

Pang X.L., Zeng S.Q., Honma S., Nakata S., Vesikari T. 2001. Effect of rotavirus vaccine on Sapporo virus gastroenteritis in Finnish infants. *Pediatrics Infectious Disease Journal*, 20: 295-300

Pang X.L., Lee B.E., Tyrrell G.J., Preiksaitis J.K. 2009. Epidemiology and genotype analysis of sapovirus associated with gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2004-2007. *Journal of Infectious Diseases*, 199: 547-551

Parashar U., Quiroz E.S., Mounts A.W., Monroe S.S., Frankhauser R.L., Ando T., Noel J.S., Bulens S.N., Beard S.R., Li J.F., Bresee J.S., Glass R.I. 2001. Norwalk-like viruses. Public health consequences and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1: 1-17

Phan T.G., Okame M., Nguyen T.A., Maneekarn N., Nishio O., Okitsu S., Ushijima H. 2004. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *Journal of Medical Virology*, 73: 256-261

Phan T.G., Okame M., Nguyen T.A., Nishio O., Okitsu S., Ushijima H. 2005. Genetic diversity of sapovirus in faecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Archives of Virology*, 150: 371-377

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

Reuter G., Zimšek-Mijovski J., Poljšak-Prijatelj M., Di Bartolo I., Ruggeri F.M., Kantala T., Maunula L., Kiss I., Kecskeméti S., Halaihel N., Buesa J., Johnsen C., Hjulsager C.K., Larsen L.E., Koopmans M., Böttiger B. 2010. Incidence, diversity and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 363-368

Rockx B., de Wit M., Vennema H., Vinjé J., de Bruin E., van Duynhoven Y., Koopmans M. 2002. Natural history of human *Calicivirus* infection: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 246-253

Schaub S.A., Oshiro R.K. 2000. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 374-380

Schuffenecker I., Ando T., Thouvenot D., Lina B., Aymard M. 2001. Genetic classification of »Sapporo-like viruses«. *Archives of Virology*, 146: 2115-2132

Svraka S., van der Veer B., Duizer E., Jojanneke D., Koopmans M., Vennema H. 2009. Novel approach for detection of enteric viruses to enable syndrome surveillance of acute viral gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 1674-1679

Svraka S., Venemaa H., van der Veer B., Hedlund K.O., Torhagen M., Siebenga J., Duizer E., Koopmans M. 2010. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 2191-2198

Viral Zone: Sapovirus. 2010. ExPASy Proteomics Server. Lausanne, Swiss Institute of Bioinformatics: 1-3

http://expasy.org/viralzone/all_by_species/196.html (13. april 2010)

Usuku S., Kumazaki M., Kitamura K., Tochikubo O., Noguchi Y. 2008. An outbreak of food-borne gastroenteritis due to sapovirus among junior high school students. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61: 438-441

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

Zimšek-Mijovski J., Poljšak-Prijatelj M., Steyer A., Barlič-Maganja D., Koren S. 2010. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infection, Genetics and Evolution*, 20: 413-420

Yan H., Yagyu F., Okitsu S., Nishio O., Ushijima H. 2003. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in faecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 114: 37-44

Yan H., Abe T., Phan T.G., Nguyen T.A., Iso T., Ikezawa Y., Ishii K., Okitsu S., Ushijima H. 2005. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *Journal of Medical Virology*, 75: 475-481

Yoshida T., Kasuo S., Azegami Y., Uchiyama Y., Satsumabayashi K., Shiraishi T., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka T. 2009. Characterization of sapoviruses

detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *Journal of Clinical Virology*, 45: 67-71

Wong M.L., Medrano J.F. 2005 Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques*, 39: 75-85

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji somentorici, asist. strok. svet. dr. Mateji Poljšak-Prijatelj za ponujeno priložnost opravljanja diplomskega dela, strokovno pomoč in nasvete, ki so me vodili pri nastanku le-tega.

Mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu in recenzentki prof. dr. Tatjani Avšič-Županc se zahvaljujem za sodelovanje ter strokoven pregled diplomskega dela.

Hvala dr. Andreju Steyerju za strokovne odgovore pri izvedbi diplomskega dela.

Iskrena hvala Ireni Šest in Marku Kolencu za pomoč pri laboratorijskem delu, sproščeno vzdušje in vse presmejane trenutke.

Posebna zahvala gre kolegici mikrobiologije Sonji Vesel za podarjeno znanje, izkazano zaupanje ter iskrenost. Hvala za vse izčrpne odgovore na premnoga vprašanja, vse napotke in druge tvoje nasvete, ki si jih nesebično delila z mano.

Za vso moralno podporo se zahvaljujem svojim staršem in sestri. Hvala vam za občutek, da se vedno lahko obrnem na vas neglede na problem. Hvala, ker ste me vedno podpirali in mi stali ob strani.

Hvala tudi Gregu za spodbudne trenutke in dejanja, ki so me motivirala k zaključku študija.

Hvala vsem, ki ste mi kakor koli pomagali v času študija.