

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja KOBAL

**ČLOVEŠKI SAPOVIRUSI V IZTREBKIH
BOLNIKOV, OBOLELIH ZA VIRUSNIM
GASTROENTERITISOM V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katja KOBAL

**ČLOVEŠKI SAPOVIRUSI V IZTREBKIH BOLNIKOV, OBOLELIH
ZA VIRUSNIM GASTROENTERITISOM V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**HUMAN SAPOVIRUSES IN FECAL SAMPLES OF PATIENTS WITH
VIRAL GASTROENTERITIS IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Maria Poljaka, za somentorico dr. Matejo Poljšak-Prijatelj in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič-Županc.

Mentor: prof.dr. Mario Poljak

Somentorica: 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: prof. dr. Mario POLJAK

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

Član: dr. Mateja POLJŠAK-PRIJATELJ

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:

Diploma je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katja Kobal

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.835.3:578.7(043)=163.6
KG	virusi/kalicivirusi/sapovirusi/virusni gastroenteritis/RT-PCR/genotipi sapovirusov
AV	KOBAL, Katja
SA	POLJAK, Mario (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	2009
IN	ČLOVEŠKI SAPOVIRUSI V IZTREBKIH BOLNIKOV, OBOLELIH ZA VIRUSNIM GASTROENTERITISOM V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 4 str., 5 pregl., 8 sl., 42 vir.
IJ	SL
JJ	sl/en
AI	V raziskavi smo želeli ugotoviti, kolikšen delež kalicivirusnih okužb v izbranih vzorcih iztrebkov predstavljajo sapovirusi ter preveriti njihovo genetsko raznolikost. Pregledali smo 155 vzorcev iztrebkov iz let od 2001 do 2007, v katerih smo z elektronsko mikroskopijo dokazali kaliciviruse, vendar smo noroviruse izključili z drugimi diagnostičnimi metodami - encimskoimunsko metodo in reakcijo RT-PCR (obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo). Sapoviruse smo z metodo RT-PCR dokazali v 17 od 155 vzorcev. Nekatere od vzorcev smo sekvenirali. Tako pri sekveniranju dela gena za od RNA odvisno RNA polimerazo, kot pri sekveniranju dela kapsidnega gena smo ugotovili 4 različne genotipe sapovirusov - GI.1, GI.2, GII.1, GII.2. Med genskimi skupinami je prevladovala genska skupina GI, ki prevladuje tudi drugod po svetu. Dokazali smo prvi izbruh sapovirusnega gastroenteritisa v Sloveniji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.835.3:578.7(043)=163.6
CX viruses/caliciviruses/sapoviruses/viral gastroenteritis/RT-PCR/sapovirus genotypes
AU KOBAL, Katja
AA POLJAK, Mario (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 2009
TI HUMAN SAPOVIRUSES IN FECAL SAMPLES OF PATIENTS WITH VIRAL GASTROENTERITIS IN SLOVENIA
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 41 p., 5 tab., 8 fig., 42 ref.
LA SI
AL sl/en
AB To identify the contribution of sapoviruses in calicivirus gastroenteritis, selected fecal samples from 155 patients were examined. The samples were collected in the years 2001 to 2007. Characteristic calicivirus particles were detected by electron microscopy. Using additional diagnostic methods, enzyme immunoassays and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), noroviruses could not be detected. Sapoviruses were detected by RT-PCR in 17 out of 155 fecal specimens. Four different sapovirus genotypes – GI.1, GI.2, GII.1, GII.2, were confirmed by sequencing of partial polymerase and capsid calicivirus gene. The predominance of GI genotype was clearly demonstrated, what corresponds to the results from other countries. The first outbreak of sapovirus gastroenteritis in Slovenia was confirmed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA	3
2.2 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI	3
2.3 KLASIFIKACIJA	5
2.4 ZNAČILNOSTI GENOMA	5
2.5 EPIDEMIOLOGIJA	7
2.5.1 Način prenosa sapovirusov	8
2.6 KLINIČNI ZNAKI	9
2.7 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE	10
2.8 DIAGNOSTIKA	10
3 MATERIALI IN METODE DE LA	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Klinični vzorci	11
3.1.2 Reagenti, potrebni za osamitev RNA s Trizolom	11
3.1.3 Komercialni komplet za osamitev virusne RNA: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)	12
3.1.4 Reagenti, potrebni za reakcijo RT-PCR	12
3.1.5 Reagenti, potrebni za analizo produktov RT-PCR z agarozno gelsko elektroforezo	13
3.1.6 Laboratorijska oprema in aparati	14
3.2 METODE	15
3.2.1 Shema poteka dela	15
3.2.2 Priprava kliničnih vzorcev	16
3.2.3 Osamitev RNA s Trizolom	16

3.2.4	Osamitev virusne RNA s komercialnim kompletom: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)	17
3.2.5	Enostopenjska reakcija verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR)	17
3.2.5.1	Pomnoževanje norovirusne RNA	19
3.2.5.2	Pomnoževanje sapovirusne RNA	19
3.2.6	Analiza produktov RT-PCR z agarozno gelsko elektroforezo	19
4	REZULTATI	21
4.1	ŠTEVILO POTRJENIH SAPOVIRUSNIH OKUŽB PO LETIH	24
4.2	STAROST BOLNIKOV	25
4.3	POŠILJATELJI VZORCEV IZTREBKOV, V KATERIH SO BILI PRISOTNI SAPOVIRUSI	26
4.4	SEKVENIRANJE POLIMERAZNEGA GENA	27
4.5	SEKVENIRANJE KAPSIDNEGA GENA	27
4.6	NEOPREDELJENI VZORCI	27
4.7	PRIMERJAVA ŠTEVILA SAPOVIRUSNIH OKUŽB GLEDE NA NOROVIRUSNE OKUŽBE V LETU 2007	27
5	RAZPRAVA	29
6	SKLEPI	33
7	POVZETEK	34
8	VIRI	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Genska klasifikacija sapovirusov (Akihara in sod., 2005).	6
Preglednica 2: Uporabljeni začetni oligonukleotidi in njihova mesta prileganja.	13
Preglednica 3: Podatki o vzorcih, v katerih smo potrdili sapoviruse.	22
Preglednica 4: Rezultati reakcij RT-PCR za sapoviruse in rezultati sekveniranja.	23
Preglednica 5: Število pozitivnih vzorcev po posameznih letih.	24

KAZALO SLIK

Slika 1: Elektronsko mikroskopski posnetek sapovirusa v iztrebku bolnika, posnet v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (Elektronsko mikroskopski posnetek: EMD 3791/07).	4
Slika 2: Značilna sapovirusna morfologija, elektronsko mikroskopski posnetek (Kohli in sod., 2005: 94).	4
Slika 3: Zgradba genomov rodov <i>Norovirus</i> , <i>Sapovirus</i> in <i>Lagovirus</i> (Green, 2007: 954).	7
Slika 4: Poti okužbe s sapovirusi (Moreno-Espinosa in sod., 2004: 240).	8
Slika 5: Shema poteka dela.	15
Slika 6: Primerjava števila testiranih vzorcev in števila pozitivnih vzorcev po posameznih letih.	24
Slika 7: Starostna porazdelitev bolnikov s sapovirusno okužbo v Sloveniji v letih od 2001 do 2007.	25
Slika 8: Delež vzorcev iztrebkov, v katerih smo dokazali sapoviruse, iz posameznih zdravstvenih ustanov.	26

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	- adenin
bp	- bazni par
C	- citozin
cDNA	- komplementarna DNA (angl.: complementary DNA)
dATP	- deoksiadenozin trifosfat
dCTP	- deoksicitozin trifosfat
dGTP	- deoksigvanozin trifosfat
ddH ₂ O	- demineralizirana in destilirana voda
DNA	- deoksiribonukleinska kislina (angl.: deoxyribonucleic acid)
dTTP	- deoksitimidin trifosfat
G	- gvanin
EIA	encimskoimunski testi (angl.: enzyme immunoassay)
kb	- kilobaza
MOV	- mali okrogli virusi
ORF	- odprti bralni okvir (angl.: open reading frame)
PBS	- fosfatni pufer (angl.: phosphate buffered saline)
RNA	- ribonukleinska kislina (angl.: ribonucleic acid)
RT-PCR	- obratno prepisovanje in verižna reakcija s polimerazo (angl.: reverse transcription and polymerase chain reaction)
T	- timin
TAE	- Tris acetatni pufer (angl.: Tris-acetate-EDTA)

1 UVOD

Sapovirusi, prej imenovani »Sapporo-like« virusi, so pomembni človeški enteropatogeni. Poleg rotavirusov, adenovirusov, astrovirusov in norovirusov so povzročitelji akutnega gastroenteritisa pri ljudeh (Phan in sod., 2005a). Spadajo v rod *Sapovirus*, ki skupaj z rodovi *Norovirus*, *Vesivirus* in *Lagovirus* tvori družino *Caliciviridae*. Sapovirusi in norovirusi okužijo večinoma ljudi, vezivirusi in lagovirusi pa okužijo živali (Hansman in sod., 2007a). Sapovirusi in norovirusi so znani kot pogosti povzročitelji izbruhov in sporadičnih primerov gastroenteritisa pri otrocih in odraslih (Ludert in sod., 2004). Okužbe s sapovirusi so manj pogoste kot okužbe z norovirusi, pojavljajo se čez vse leto, medtem ko so okužbe z norovirusi pogostejše v zimskih mesecih (Yan in sod., 2003). Gastroenteritis, ki ga povzročajo sapovirusi, je v večini primerov blažji kot gastroenteritis, povzročen z norovirusi, vendar pa lahko sapovirusi povzročijo tudi težje oblike bolezni, pri katerih je potrebna hospitalizacija (Farkas in sod., 2006).

V Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov določajo povzročitelje gastroenteritičnih okužb z neposrednimi metodami elektronske mikroskopije, encimskoimunskimi metodami (EIA) in molekularnimi metodami (RT-PCR). Pri kalicivirusih z encimskoimunskimi in molekularnimi metodami določajo le noroviruse. Pomen sapovirusov kot povzročiteljev gastroenteritisa v Sloveniji še ni bil raziskan.

Da bi ugotovili prisotnost sapovirusov pri bolnikih obolelih zaradi kalicivirusnega gastroenteritisa, pri katerih ni bila dokazana okužba z norovirusi, smo v vzorcih iztrebkov bolnikov obolelih za kalicivirusnim gastroenteritisom v letih od 2001 do 2007, v katerih z metodama EIA in RT-PCR ni bilo dokazanih norovirusov, ugotavljali okužbo s sapovirusi z elektronsko mikroskopijo, RT-PCR in sekveniranjem delov genoma za virusno polimerazo in kapsidno beljakovino.

1.1 NAMEN DELA

1.1.1 Cilji raziskave

Izbrali smo iztrebke bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom, ki so bili predhodno diagnosticirani z elektronsko mikroskopijo kot kalicivirusi ali mali okrogli virusi. Pri molekularnih metodah za dokaz sapovirusov smo izbrali različne začetne oligonukleotide, ki nalegajo na različnih odsekih virusne RNA. Ugotoviti smo želeli, kolikšen delež kalicivirusnih okužb povzročajo sapovirusi v Sloveniji in ugotoviti morebitno genetsko raznolikost sapovirusnih sevov.

1.1.2 Delovne hipoteze

Večino laboratorijsko dokazanih kalicivirusnih gastroenteritisov pri ljudeh povzročajo norovirusi, sapovirusi pa le manjši del. Predpostavljamo, da bo tako tudi v Sloveniji. Prav tako pričakujemo med sapovirusi veliko genetsko raznolikost, saj je ta že potrjena in objavljena v literaturi (Farkas in sod., 2004).

2 PREGLED OBJAV

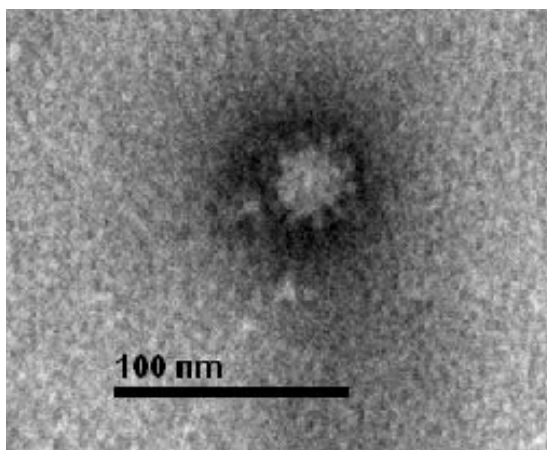
2.1 ZGODOVINA

Akutni gastroenteritis je ena od najpogostejših boleznih pri ljudeh. Povzročajo ga bakterije, virusi in paraziti. Leta 1972 so z elektronsko mikroskopijo odkrili prvega virusnega povzročitelja gastroenteritisa, virus Norwalk, ki je danes uvrščen v družino *Caliciviridae*, rod *Norovirus*.

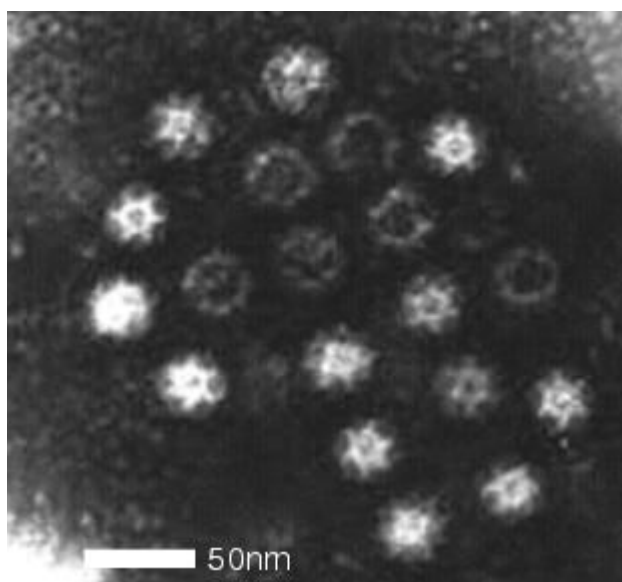
Sapoviruse so včasih imenovali kot klasične kaliciviruse. Morfološko značilne kaliciviruse sta v vzorcih črevesja prvič odkrila Madeley in Cosgrove leta 1976. Kaliciviruse sta našla v vzorcih iztrebkov desetih otrok z gastroenteritisom. Ker pa nekaj bolnikov ni imelo kliničnih znakov, nista mogla povsem dokazati patogenosti virusov (Altmar in Estes, 2001). Sapoviruse so prvič poimenovali po japonskem mestu Sapporo, kjer je oktobra leta 1977 v sirotišnici izbruhnila epidemija gastroenteritisa. Takrat so z elektronsko mikroskopijo vzorcev črevesja bolnikov z gastroenteritisom dokazali značilne kaliciviruse. Danes je to tipski sev Sapporo. Osem let kasneje, leta 1995, je bilo objavljeno nukleotidno in aminokislinsko zaporedje genoma sapovirusa Manchester (Okada in sod., 2006b).

2.2 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI

Virusi imajo ikozaedrično kapsido z 32 čašastimi vdrtinami, po katerih je poimenovana družina *Caliciviridae*. Ime izvira iz latinske besede »calyx«, ki pomeni »čaša« in se nanaša na čašaste vdrtine na obodu, vidne z elektronsko mikroskopijo (Altmar in Estes, 2001).



Slika 1: Elektronsko mikroskopski posnetek sapovirusa v iztrebku bolnika, posnet v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (Elektronsko mikroskopski posnetek: EMD 3791/07).



Slika 2: Značilna sapovirusna morfologija, elektronsko mikroskopski posnetek (Kohli in sod., 2005: 94).

Premer kapside je 41 do 46 nm. Virusi nimajo ovojnice (Hansman in sod., 2007c).

Zaradi nezmožnosti razmnoževanja v celičnih kulturah ali v poskusnih živalih, je razumevanje imunogenosti in patogeneze človeških kalicivirusov nepopolno (Chen in sod., 2006). Razumevanje molekularne biologije teh virusov je omogočeno z ekspresijo beljakovin kapside z bakulovirusnim ekspresijskim sistemom. Beljakovine kapside se sestavijo v virusom podobne delce (angl. virus like particles, VLP), ki so morfološko,

antigeno in imunološko podobni izvirnim virionom. Te lahko nadalje preučujemo (Chen in sod., 2004).

2.3 KLASIFIKACIJA

Taksonomija sapovirusov je prvotno temeljila na morfologiji, danes pa temelji na genskem sekveniranju in filogenetskih analizah (Lopman in sod., 2002).

Sapovirusi spadajo v družino *Caliciviridae*, rod *Sapovirus*. V družini *Caliciviridae* so 4 rodovi virusov: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus* in *Lagovirus* (Hansman in sod., 2007a). Virusi iz te družine okužijo človeka in različne živali (Chen in sod., 2006). Človeške kaliciviruse predstavljata rodova *Norovirus* in *Sapovirus*. Sapovirusi povzročajo gastroenteritis tudi pri prašičih (Hansman in sod., 2005a). Klasifikacija kalicivirusov je do sedaj temeljila na nukleotidnem in aminokislinskem zaporedju celotnega kapsidnega gena, predvsem zato, ker sapovirusov, norovirusov in lagovirusov ne moremo namnožiti in osamiti v celičnih kulturah (Fullerton in sod., 2007). Veziviruse lahko gojimo *in vitro* (Noel in sod., 1997). Na podlagi nukleotidnega zaporedja kapsidnega gena razdelimo sapoviruse na 5 genskih skupin. Virusi iz genske skupine I, II, IV in V okužijo ljudi, virusi iz genske skupina III pa prašiče (Hansman in sod., 2007a).

2.4 ZNAČILNOSTI GENOMA

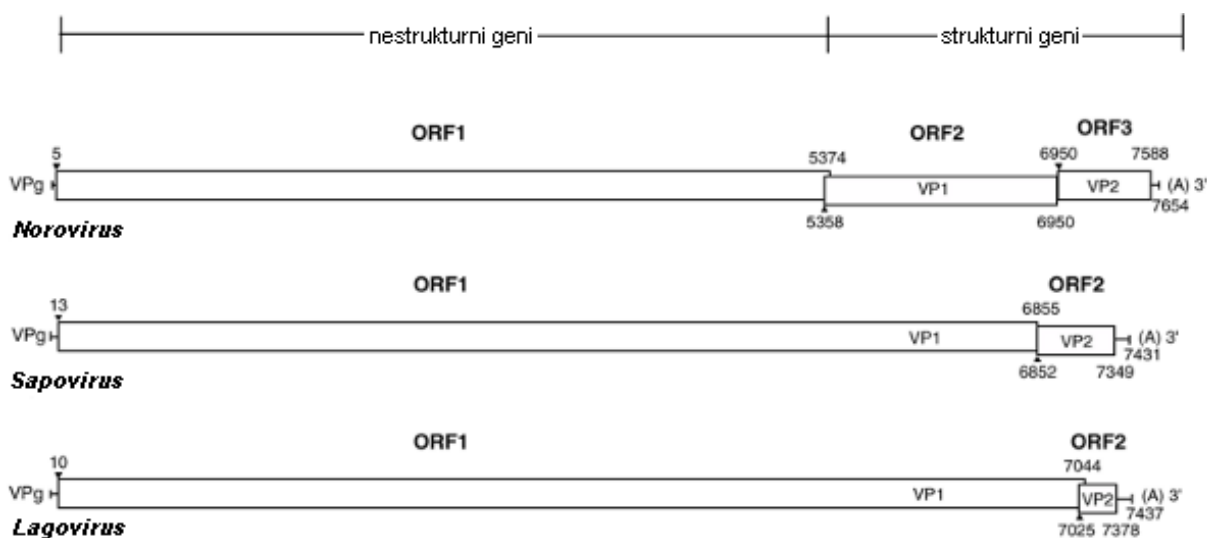
Genom sapovirusov je pozitivno polarna, enovijačna molekula RNA, dolga od 7.3 do 7.5 kb (Phan in sod., 2007). Glede na nukleotidno zaporedje kapsidne beljakovine delimo sapoviruse na 5 genskih skupin. Genska skupina GI verjetno v svetu prevladuje (Hansman in sod., 2007b). Genski skupini GI in GII delimo dalje na genotipe (Hansman in sod., 2007a). Akihara s sodelavci je leta 2005 gensko skupino GI razdelil na 8, GII pa na 5 genotipov (Akihara in sod., 2005).

Preglednica 1: Genska klasifikacija sapovirusov (Akihara in sod., 2005).

Gostitelj	Genska skupina	Število genotipov
Človek	GI	8
Človek	GII	5
Prašič	GIII	1
Človek	GIV	1
Človek	GV	1

Genske skupine GI, GIV in GV imajo 3 odprte bralne okvirje (angl.: Open reading frame, ORF), GII in GIII pa 2 odprta bralna okvirja (Okada in sod., 2006a). ORF1 kodira en sam polipeptid, ki se z virusnimi proteazami po translaciji cepi na funkcionalne beljakovine. Iz tega nastanejo nestrukturirane beljakovine, pomembne za pomnoževanje virusnega genoma. Med njimi ima od RNA odvisna RNA polimeraza najpomembnejšo vlogo. Iz posttranslacijsko cepljenega polipeptida nastane tudi beljakovina kapside (Fullerton in sod., 2007). ORF2 in ORF3 kodirata beljakovine še neznane funkcije (Hansman in sod., 2007a).

Organizacija sapovirusnega genoma je podobna organizaciji genoma kunčjih kalicivirusov (angl.: Rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV) iz rodu *Lagovirus*, kjer je kapsidni gen prav tako združen z genom za nestrukturirane beljakovine (Farkas in sod., 2004).



Slika 3: Zgradba genomov rodov *Norovirus*, *Sapovirus* in *Lagovirus* (Green, 2007: 954).

Najbolj ohranjena regija genoma je spoj polimeraznega in kapsidnega gena (Okada in sod., 2006). V tej ohranjeni regiji je podobnost med sapovirusi in norovirusi 27-32 % in podobnost med sapovirusi in živalskimi kalicivirusi, 35-39 % (Numata in sod., 1997).

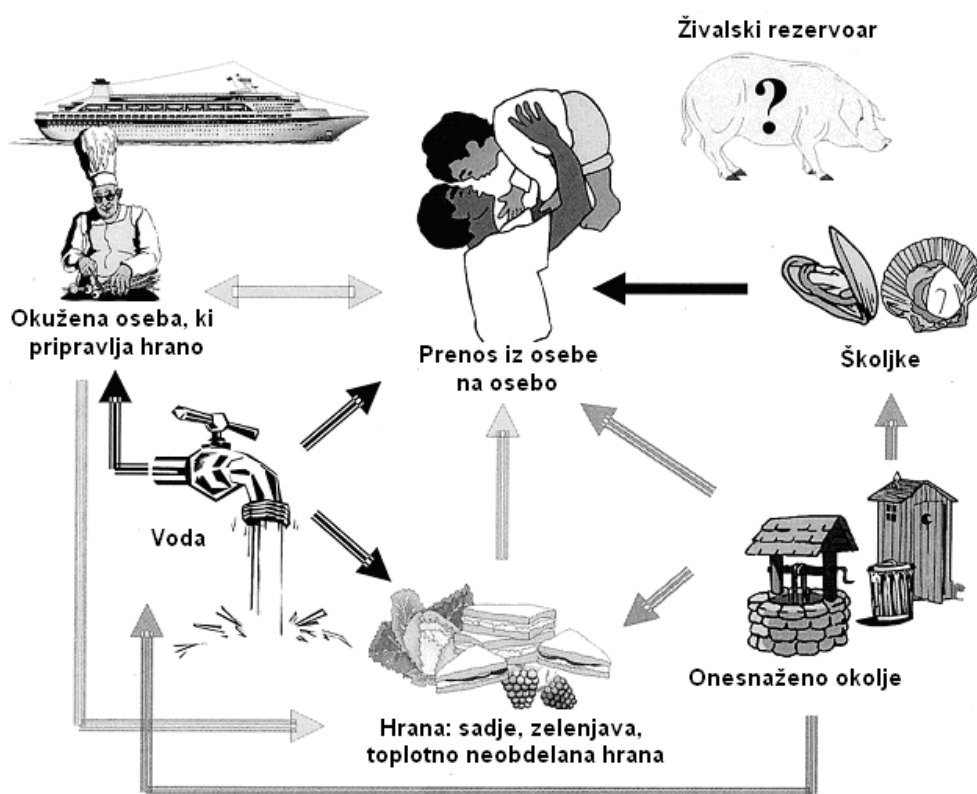
2.5 EPIDEMIOLOGIJA

Sapovirusi so razširjeni po vsem svetu, kar so pokazale seroepidemiološke preiskave pri odraslih (Vasickova in sod., 2005). Okužbe s sapovirusi so najpogostejše pri dojenčkih in majhnih otrocih ter pri starejših. Količina protiteles proti sapovirusom v serumu je najnižja v prvem letu življenja in se po dveh letih poveča (Phan in sod., 2005b). Okužba se najpogosteje pojavi pri otrocih, mlajših od petih let (Phan in sod., 2005a). V starosti od 1 do 3 mesecev je imelo manj kot 25 % otrok prisotna protitelesa proti sapovirusom (Farkas in sod., 2006). Dojenčke pred okužbo ščitijo materina protitelesa (Numata in sod., 1997). Stopnja asimptomatskih okužb s sapovirusi je pri otrocih visoka (Farkas in sod., 2000). Tudi v primeru asimptomatske okužbe ter po prenehanju kliničnih znakov, lahko posameznik izloča virus in okuži druge ljudi. Praktično vsi otroci se okužijo do petega leta starosti. Okužbe s sapovirusi se pojavljajo čez vse leto (Hansman in sod., 2007b).

2.5.1 Način prenosa sapovirusov

Rizični faktor za okužbo s sapovirusi je kontakt z okuženo osebo (White, 2006). Virusi se prenašajo predvsem po fekalno-oralni poti in z aerosoli, ki nastajajo pri bruhanju okuženih oseb (Moreno Espinosa in sod., 2004).

Sapoviruse so našli v školjkah (Lopman in sod., 2002), v vzorcih odpadnih vod, prečiščenih odpadnih vod in rečne vode (Hansman in sod., 2007a). Ujemanje nukleotidnih zaporedij genomov sapovirusov, izoliranih iz vode in školjk, z nukleotidnimi zaporedji sapovirusov iz iztrebkov bolnikov potrjuje, da s fekalijami onesnaženo okolje lahko vodi do okužb ljudi s hrano in vodo (Hansman in sod., 2007c).



Slika 4: Poti okužbe s sapovirusi (Moreno-Espinosa in sod., 2004: 240).

Sporadični primeri in izbruhi sapovirusnega gastroenteritisa se pojavljajo v vrtcih, šolah, bolnišnicah, na ladjah križarkah, v restavracijah, domovih za ostarele, vendar le redko pri mlajših od 65 let ter med vojaškimi rekruti (Phan in sod., 2005 a).

V primerjavi z norovirusi so sapovirusi manj znani in raziskani. Morda je razlog ta, da okužijo predvsem majhne otroke, pri katerih je okužba velikokrat asimptomatska. Gastroenteritis, povzročen s sapovirusi, je v večini primerov milejši kot gastroenteritis, ki ga povzročajo norovirusi, zato se z določanjem sapovirusov ukvarja manj laboratorijev (Moreno Espinosa in sod., 2004).

2.6 KLINIČNI ZNAKI

Sapovirusi povzročajo gastroenteritis. Okužba je običajno samoomejujoča in hitro izzveni. Pri ljudeh je zelo pogosta in povzroča majhno smrtnost (Green, 1997). Pričetek bolezni je nenaden, navadno 24 do 48 ur po okužbi. Bolezen je kratkotrajna. Traja od 12 do 60 ur. Posamezniki lahko izločajo viruse do 2 tedna po okužbi (Moreno Espinosa in sod., 2004). Velik odstotek bolnikov ima drisko, trebušne krče, vročino, bruhanje in jim je slabo. Sapovirusi se večinoma prenašajo po fekalno-oralni poti. Virusi so odporni na kislino, gredo skozi želodec do tankega črevesja, kjer naj bi se razmnoževali. Znanje o patogenezi človeških kalicivirusov so dobili iz raziskav, ki so jih v ZDA izvajali na prostovoljcih. S svetlobnim in elektronskim mikroskopom so opazili rane v sluznici tankega črevesja bolnikov. Sluznica se vname, absorpcijske epiteljske celice se spremenijo. Črevesni vili se odebelijo, mikrovili se skrajšajo. Poškodbe na sluznici tankega črevesja preprečujejo zadostno absorpcijo vode in hranilnih snovi. Po 2 tednih se tanko črevo vrne v normalno histološko stanje (Lopman in sod., 2002).

2.7 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE

Za okužbo s sapovirusi ni posebnega zdravljenja (Glass in sod., 2000). Zdravljenje je simptomatsko, navadno je potrebna le oralna rehidracija. Hospitalizacija zaradi rehidracije je za odrasle redko potrebna. V redkih primerih bolnikom intravensko dovajajo tekočino. Za preprečevanje in zdravljenje kalicivirusnih okužb trenutno ni nobenega cepiva, niti zdravila (Atmar in Estes, 2002).

Okužbe preprečujemo z izvajanjem ustrezne higiene (Glass in sod., 2000). V bolnišnicah je ključno pogosto umivanje rok osebja ter dosledno razkuževanje površin. Za preprečevanje okužb z vodo je potrebno kloriranje vode. Pri preprečevanju okužb s hrano je ključna osebna higiena pripravljavcev hrane (Parashar in sod., 2001).

2.8 DIAGNOSTIKA

Človeških kalicivirusov ne moremo gojiti *in vitro*. Sapoviruse so najprej dokazali z elektronsko mikroskopijo. Ta metoda je pogosto premalo občutljiva, saj je za pozitiven rezultat potrebno imeti vsaj 10^6 virusov/ml kužnine (Atmar in Estes, 2001). Danes laboratorijska diagnostika gastroenteritičnih virusov vključuje elektronsko mikroskopijo, antigenske encimskoimunske teste in molekularne tehnike (RT-PCR) (Yan in sod., 2003). Encimskoimunski testi za ugotavljanje kalicivirusnih protiteles se uporabljajo samo v raziskovalnih laboratorijih. Najbolj uporabljena metoda za detekcijo sapovirusov je RT-PCR. Metoda ima visoko občutljivost, lahko jo uporabljamo za genetske analize in molekularne epidemiološke študije (Hansman in sod., 2007c).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Klinični vzorci

V raziskavo smo vključili 155 izbranih kliničnih vzorcev iztrebkov bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom, ki so v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani prispeli v obdobju 7 let, od januarja leta 2001 do decembra leta 2007. Vzorci so bili z EIA metodo preiskani na adenoviruse, astroviruse in rotaviruse, katerih nismo zaznali. Z metodama RT-PCR in EIA so bili preiskani tudi na noroviruse in bili negativni. Iztrebke smo suspendirali v fosfatnem pufru, da smo dobili 10 % suspenzijo in jih centrifugirali (1600x g, 5 min). Supernatant smo do preiskave hranili pri temperaturi -20 °C.

3.1.2 Reagenti, potrebni za osamitev RNA s Trizolom

- TRIzol LS Reagent (Invitrogen)
- Kloroform (Merck)
- Izopropanol (Merck)
- 75 % etanol, pripravljen iz absolutnega etanola (Merck)
- Demineralizirana in destilirana sterilna voda (ddH₂O), brez ribonukleazne aktivnosti (Promega)
- Epruvete z gelom Maxtract (2,0 ml, Qiagen)

3.1.3 Komercialni komplet za osamitev virusne RNA: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

- Kolone (QIAamp mini spin columns)
- Nosilec RNA
- Zbiralne epruvete 2ml
- Epruvete 1,5 ml
- Pufri brez ribonukleazne aktivnosti:
 - Lizacijski pufer AWL, vsebuje kaotropne soli
 - Spiralni pufer AW1 (koncentrat), vsebuje kaotropne soli
 - Spiralni pufer AW2 (koncentrat), vsebuje natrijevo kislino
 - Elucijski pufer AWE, vsebuje natrijevo kislino

3.1.4 Reagenti, potrebni za reakcijo RT-PCR

1. Komercialni komplet SuperscriptTM One Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen), ki vsebuje:
 - 50x mešanico reverzne transkriptaze in polimeraze: RT/Platinum Taq mix
 - 2x reakcijsko mešanico (pufer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP in MgSO₄)
2. ddH₂O brez ribonukleazne aktivnosti

3. Začetni oligonukleotidi

Preglednica 2: Uporabljeni začetni oligonukleotidi in njihova mesta prileganja.

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'- 3'	Mesto prileganja	Referenca
JV12Y (+)	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 - 4572	Vennema in sod., 2002
JV13I (-)	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 - 4878	Vennema in sod., 2002
SR80 (+)	TGGGATTCTACACAAAACCC	4366 - 4385	Noel in sod., 1997
JV33 (-)	GTGTANATGCARTCATCACC	4666 - 4685	Vinje in sod., 2000
SLV5317 (+)	CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT	5083 - 5105	Yan in sod., 2003
SLV5749 (-)	CGGRCYTCAAAAVSTACCBCCCCA	5516 - 5494	Yan in sod., 2003
P290 (+)	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	4568 - 4590	Jiang in sod., 1999
P289 (-)	TGACAATGTAATCATCACCATA	4865 - 4886	Jiang in sod., 1999

I – inozin (dovoljuje parjenje z vsemi štirimi bazami)

Y – C/T

N – katerakoli od štirih baz

R – A/G

B – C/G/T

R – A/G

W – A/T

3.1.5 Reagenti, potrebni za analizo produktov RT-PCR z agarozno gelsko elektroforezo

- Agaroz (Promega)
- 1x puferska raztopina TAE, ki jo pripravimo iz 50x puferske raztopine TAE
- Etidijev bromid, koncentracije 5 mg/ml
- 6x nanašalni pufer (6x DNA Loading Dye, Fermentas)
- Označevalec DNA 100bp (GenerulerTM 100bp + DNA; 0,1µg/µl, Fermentas)

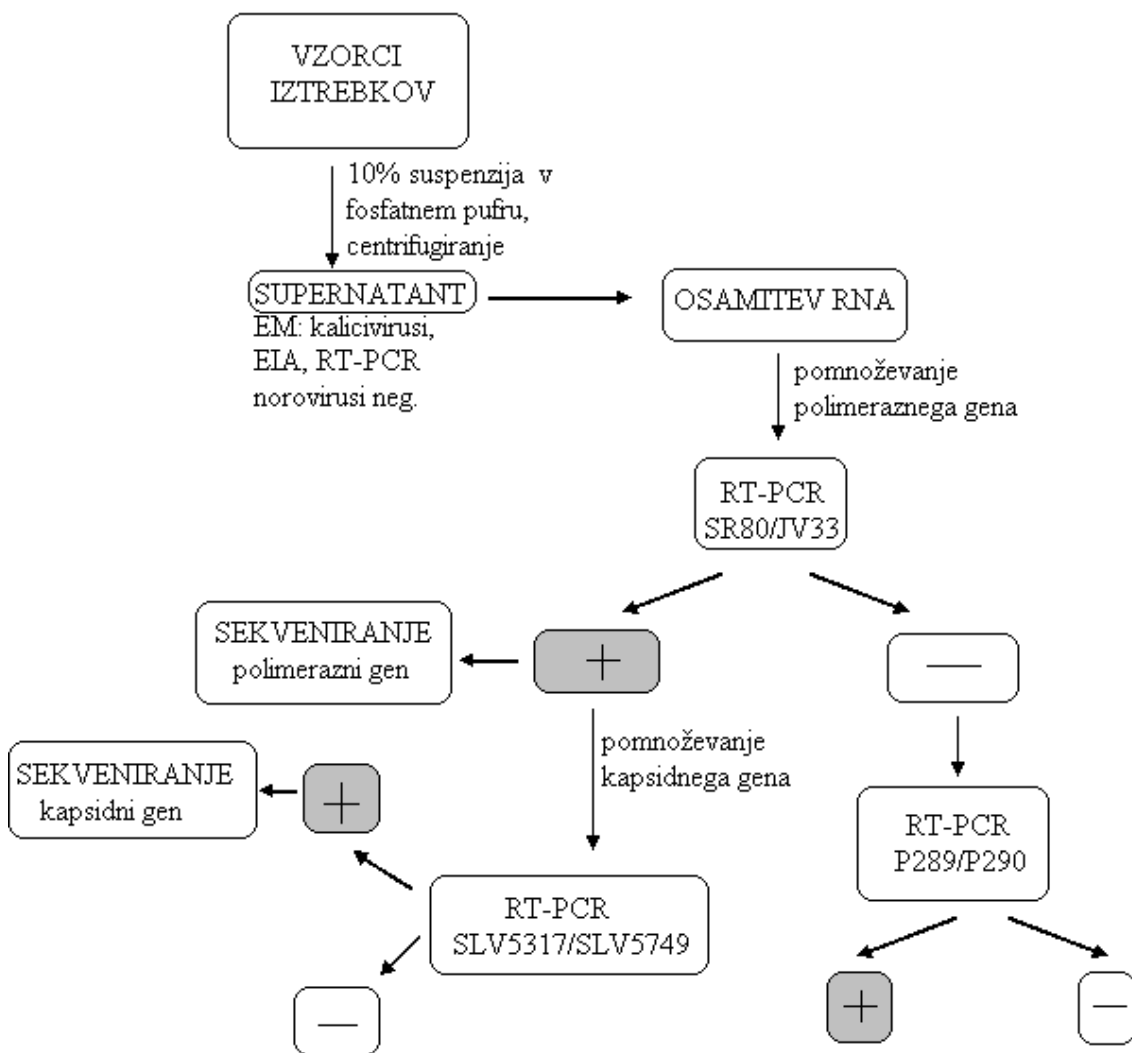
3.1.6 Laboratorijska oprema in aparati

- Brezprašna komora (Iskra PIO)
- Mikrobiološka komora (LFV 9)
- Hlajena namizna centrifuga (Eppendorf centrifuge 5415R)
- Mešalo (Tehtnica Železniki, Biosan)
- Stojalo za epruvete (Eppendorf)
- Avtomatske pipete Eppendorf z območji pipetiranja 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l.
- Nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- Tehtnica (Sartorius)
- Mikrovalovna pečica (MWG 729, Clatronic)
- Termopomnoževalnika (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400; Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700)
- Napajalnik za elektroforezo (LKB Bromma, 2301 Macrodrive1)
- Kadička za elektroforezo (Bio Rad, Wide Mini Sub Cell GT)
- Komora za snemanje agaroznih gelov (BIO-RAD Gel doc 2000)
- Računalniški program (Quantity one, BIO-RAD)
- Erlenmajerice
- Merilni valj
- Staničevina
- Epruvete (CLP)
- Zaščitne rokavice brez smukca (Safeskin)

3.2 METODE

3.2.1 Shema poteka dela

Na sliki 5 je prikazana shema poteka raziskovalnega dela.



Slika 5: Shema poteka dela.

3.2.2 Priprava kliničnih vzorcev

V fosfatnem pufru (0,1M PBS) smo suspendirali približno 1 g iztrebka, centrifugirali 5 minut pri 1600x g in supernatant shranili pri temperaturi -20 °C do nadaljnje obdelave.

3.2.3 Osamitev RNA s Trizolom

Virusno RNA smo osamili v komori za sterilno delo. Uporabljali smo nastavke s filtri in materiale ter opremo brez ribonukleazne aktivnosti. Med delom smo zaradi preprečevanja kontaminacije vzorca z RNazami pogosto menjavali rokavice. Vzorce smo centrifugirali pri 4°C.

Vzorce, shranjene na -20°C, smo pred izolacijo odmrznili ter premešali na mešalu. Po 250 µl vzorca smo odpipetirali v 1,5 ml mikrocentrifugirke, označene s številko vzorca in jih prenesli v komoro za sterilno delo. Vzorcem smo dodali 750 µl reagenta TRIzol. Vse skupaj smo resuspendirali s pipetiranjem in inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo dodali 200 µl kloroforma in vsebino mikrocentrifugirke premešali na mešalu. Vso vsebino mikrocentrifugirk smo prenesli v enako označene mikrocentrifugirke z gelom, ki smo jih predhodno centrifugirali, da se je gel zbral na dnu. Po 5-10 min inkubaciji sta se jasno ločili zgornja vodna in spodnja organska faza. Vsebino mikrocentrifugirk smo centrifugirali 5 min na 14000x g. Maxtract gel je tvoril mejo med vodno in organsko fazo. Zgornjo vodno fazo z RNA smo prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in dodali 500 µl izopropanola. Vsebino mikrocentrifugirk smo dobro premešali in inkubirali 10 min na sobni temperaturi. Nato smo jih 10 min centrifugirali na 16000x g. Supernatant smo odlili v odlagalnik v komori za sterilno delo in precipitirano RNA sprali s 500 µl 75% etanola, premešali na mešalu in centrifugirali 5 min na 9300x g. Supernatant smo odlili v odlagalnik in s staničevino popivnali ostanek etanola z roba mikrocentrifugirke. Odprte mikrocentrifugirke smo obrnjene navzdol položili na staničevino in jih pustili v komori pri največjem pretoku zraka, da se je RNA posušila.

Posušeno RNA smo raztopili v 30 µl destilirane in demineralizirane sterilne vode brez nukleazne aktivnosti in jo shranili do uporabe pri temperaturi -80°C.

3.2.4 Osamitev virusne RNA s komercialnim kompletom: QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

Osamitev virusne RNA smo opravili v komori za sterilno delo. Uporabljali smo nastavke s filtri in materiale ter opremo brez ribonukleazne aktivnosti. Med delom smo zaradi preprečevanja kontaminacije vzorca z RNazami pogosto menjavali rokavice. Vzorce smo centrifugirali pri sobni temperaturi. Vzorce, razredčene z 0,1 M pufrom PBS in shranjene pri temperaturi -20°C smo pred izolacijo odmrznili in premešali na mešalu. Virusno RNA smo osamili s komercialnim kompletom za osamitev virusne RNA (QIAamp Viral RNA Mini Kit). Osamitev je potekala po navodilih proizvajalca. Najprej smo vzorec lizirali s pufrom AWL, z dodanim nosilcem RNA. S tem smo inaktivirali RNAze in omogočili osamitev nepoškodovane virusne RNA. Nato smo vzorce prenesli na kolone. Virusna RNA se je vezala na membrano, nečistoče pa smo sprali v dveh zaporednih korakih, z uporabo pufov AW1 in AW2. Virusno RNA smo sprali iz kolone s pufrom AWE, ki ni vseboval RNAz. Virusno RNA smo do uporabe hranili pri temperaturi -80°C.

3.2.5 Enostopenjska reakcija verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR)

Pri virusih z RNA moramo pred izvajanjem reakcije PCR osamljeno RNA z encimom reverzno transkriptazo prepisati v komplementarno DNA (cDNA, angl.: complementary DNA). Za prepis kalicivirusne RNA smo uporabili spremenjeno obliko reverzne transkriptaze iz virusa mišje levkemije (angl.: Moloney Murine Leukemia Virus). Reakcija je enostopenjska, ker reverzni prepis in pomnoževanje DNA potekata v eni epruveti, kar zmanjša možnost kontaminacije.

Za izvedbo RT-PCR smo uporabljali reagente komercialnega kompleta Superscript™ One Step RT-PCR with Platinum Taq. V označene 0,2 ml epruvetke smo najprej odpipetirali po 1 µl reverznega začetnega oligonukleotida s koncentracijo 50 pmol/µl in 5 µl vzorca RNA ali 5 µl 10x redčenega vzorca RNA v ddH₂O. Vzorce smo redčili zaradi možnih prisotnih inhibitorjev pomnoževanja fragmenta RNA. Za pozitivno kontrolo smo začetnemu oligonukleotidu dodali 5 µl sapovirusne RNA, predhodno potrjene z RT-PCR in sekveniranjem. Za negativno kontrolo smo uporabili ddH₂O. Epruvetke smo vstavili v termopomnoževalnik in nastavili program za denaturacijo (5 minut pri 95 °C).

Med denaturacijo smo pripravili reakcijsko mešanico za določeno število vzorcev.

Mešanica za en vzorec je vsebovala:

- 17 µl ddH₂O
- 25 µl 2x pufra
- 1 µl začetnega oligonukleotida s koncentracijo 50 pmol/µl
- 1 µl encimske mešanice

Po 44 µl mešanice smo dodali denaturirani nukleinski kislini, tako da je bil končni volumen v epruvetki 50 µl. Nastavili smo program za reakcijo RT-PCR. Pri 45 °C je 30 minut potekal prepis RNA v cDNA. Nato je poteklo 40 temperaturnih ciklov:

- 15 s na 94 °C (denaturacija DNA)
- 30 s na 55 °C ali 37 °C ali 49 °C (prileganje začetnih oligonukleotidov)
- 1 min na 72 °C (podaljševanje začetnih oligonukleotidov)

Reakcija RT-PCR se je zaključila s 5 minutnim končnim podaljševanjem pri 72 °C in ohlajanjem produkta na 4 °C.

3.2.5.1 Pomnoževanje norovirusne RNA

Za določanje človeških norovirusov smo izbrali začetna oligonukleotida, JV12Y in JV13I, ki pomnožujeta 326 bp dolg ohranjen odsek gena za od RNA odvisno RNA polimerazo (Preglednica 3-1). Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37 °C.

3.2.5.2 Pomnoževanje sapovirusne RNA

Za določanje sapovirusov smo uporabili začetna oligonukleotida SR80 in JV33, ki pomnožujeta del gena za od RNA odvisno RNA polimerazo, vseh znanih sapovirusnih genotipov. Par začetnih oligonukleotidov pomnožuje 319 bp dolg odsek gena na ORF1 (Vinjé in sod., 2000), (Preglednica 3-2). Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 37 °C.

Začetna oligonukleotida SLV5317 in SLV5749 smo uporabili za pomnoževanje dela kapsidnega gena na ORF1 sapovirusnega genoma. Pomnožek je dolg 434 bp (Yan in sod., 2003), (Preglednica 3-3). Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 55 °C.

Par začetnih oligonukleotidov P289 in P290 pomnožuje tako del sapovirusnega, kot tudi norovirusnega polimeraznega gena. Velikost RT-PCR produkta pri pomnoževanju dela sapovirusnega RNA polimeraznega gena, ki se nahaja na ORF1, je 331 bp (Preglednica 3-4). Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je bila 49 °C.

3.2.6 Analiza produktov RT-PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Produkte reakcije RT-PCR smo določali z elektroforezo v 1,5% agaroznem gelu, pripravljenem iz 1,2 g agaroze in 75 ml 1x TAE pufra. Agarozo v pufri TAE smo segreli v mikrovalovni pečici. Tekoči gel smo ohladili na približno 60 °C, dodali 5 µl etidijevega bromida (5mg/ml) in premešali. Gel smo nalili v plastičen nosilec, kamor smo namestili

glavniček za vdolbinice. Iz gela smo odstranili mehurčke zraka, ki bi motili potovanje vzorcev po gelu. Polimeriziran gel smo skupaj z nosilcem predstavili v kadičko za elektroforezo in dolili 1x pufer TAE tako, da je bil gel v celoti prekrit.

Iz gela smo odstranili glavniček in v vdolbinice nanесли vzorce, pozitivno in negativno kontrolo in komercialno pripravljen molekularni označevalec DNA (100bp) po naslednjem postopku:

- 10 μ l vzorca ali kontrole smo v mikrotitrski ploščici zmešali s 3 μ l nanašalnega pufera ter 10 μ l mešanice odpipetirali v vdolbinico gela
- 5 μ l molekularnega označevalca DNA smo odpipetirali v vdolbinico gela

Elektroforeza je potekala 40 minut pri napetosti 90 V.

Po končani elektroforezi smo gel analizirali z UV presvetljevalcem, sliko posneli s kamero in z računalniškim programom gel dokumentirali.

4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 155 izbranih kliničnih vzorcev iztrebkov bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom, ki so v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani prispeli v obdobju 7 let, od januarja leta 2001 do decembra leta 2007. V preiskanih vzorcih iztrebkov iz let 2005 do 2007, smo z elektronskim mikroskopom določili kaliciviruse ali male okrogle viruse (MOV). Ker smo z molekularnim določanjem sapovirusov dobili pozitivne rezultate le pri vzorcih, pri katerih smo z elektronskim mikroskopom določili značilno kalicivirusno morfologijo, smo pri ostalih vzorcih (iz let 2001 do 2004) obravnavali samo te.

S pomnoževanjem gena za virusno polimerazo z začetnima oligonukleotidoma SR80/JV33 smo dobili 14 pozitivnih rezultatov, 8 iz leta 2007, 3 iz leta 2006 in 1 iz leta 2005 (Preglednica 4). V vzorcih, pri katerih smo pričakovali sapoviruse in jih nismo dokazali z začetnima oligonukleotidoma SR80/JV33, smo izvedli reakcijo RT-PCR še s parom začetnih oligonukleotidov P289/P290, ki je manj specifičen. Poleg sapovirusnega genoma pomnožuje tudi norovirusnega (Jiang in sod., 1999). S tem smo določili dodatne 3 pozitivne vzorce, 1 iz leta 2006 in 2 iz leta 2001. Vzorec iz leta 2007, v katerem smo že predhodno potrdili sapoviruse, je bil uporabljen kot pozitivna kontrola (Preglednica 4).

Vzorci, pri katerih smo dokazali sapoviruse z začetnima oligonukleotidoma, ki pomnožujeta del polimeraznega gena, smo pomnožili še z začetnima oligonukleotidoma SLV5317/SLV5749, ki pomnožujeta del kapsidnega gena sapovirusov. Od 15 pomnoženih vzorcev RNA, smo dobili 13 pozitivnih rezultatov, 8 iz leta 2007, 2 iz leta 2006, 1 iz leta 2005, 1 iz leta 2003 in 1 iz leta 2002 (Preglednica 4).

V 17 vzorcih so bili vsaj z enim parom začetnih oligonukleotidov dokazani sapovirusi.

Uspešno smo posekvenirali 5 vzorcev, pri katerih smo dobili pozitiven rezultat pri pomnoževanju dela gena za virusno polimerazo in 10 vzorcev, pri katerih smo dobili pozitiven rezultat pri pomnoževanju dela kapsidnega gena sapovirusov.

Preglednica 3: Podatki o vzorcih, v katerih smo potrdili sapoviruse.

ZAPOREDNA ŠTEVILKA vzorca	Številka VZORCA in LETO odvzema	POŠILJATELJ vzorca	STAROST bolnika
1	198/2007	Inf.kl.otr.*	1 mesec
2	2124/2007	Inf. kl. otr.	2 leti
3	2276/2007	Inf. kl.**	6 let
4	2567/2007	Inf. kl.	1 leto
5	2615/2007	Inf. kl.	3 leta
6	2629/2007	Inf. kl.	7 let
7	3791/2007	Zdravstveni dom Ljubljana	86 let
8	3951/2007	Inf. kl.	1 leto
9	327/2006	Inf. kl.	68 let
10	782/2006	Pediatrična klinika	1 leto
11	1848/2006	Inf. kl.	1 leto
12	2152/2006	Inf. kl. otr.	2,5 let
13	2496/2005	Pediatrična klinika	2 leti
14	1797/2003	Zavod za zdravstveno varstvo Kranj	8 mesecev
15	1151/2002	Inf. kl.	epidemija
16	21/2001	Inf. kl.	21 mesecev
17	287/2001	Pediatrična klinika	9,5 let

* Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, otroški oddelek.

** Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja.

Preglednica 4: Rezultati reakcij RT-PCR za sapoviruse in rezultati sekveniranja.

ZAPOREDNA ŠTEVILKA vzorca	Številka VZORCA in LETO odvzema	RT-PCR SR80/JV33	RT-PCR P289/P290	RT-PCR SLV5317/SLV 5749	GENOTIP polimeraznega gena (genska skupina in genotip)	GENOTIP kapsidnega gena (genska skupina in genotip)
1	198/2007	+	-	+	GI.1	GI.1
2	2124/2007	+	+	+	GI.2	GI.2
3	2276/2007	+	-	+	NT	GI.1
4	2567/2007	+	NT	+	NT	NT
5	2615/2007	+	NT	+	GI.2	GI.2
6	2629/2007	+	NT	+	NT	NT
7	3791/2007	+	NT	+	NT	GI.2
8	3951/2007	+	NT	+	NT	GI.2
9	327/2006	+	NT	-	NT	NT
10	782/2006	+	NT	+	GII.1	GII.1
11	1848/2006	-	+	NT	NT	NT
12	2152/2006	+	NT	+	GII.2	GII.2
13	2496/2005	+	NT	+	NT	NT
14	1797/2003	+	NT	+	NT	GI.1
15	1151/2002	+	NT	+	NT	GII.2
16	21/2001	-	+	NT	NT	NT
17	287/2001	-	+	NT	NT	NT

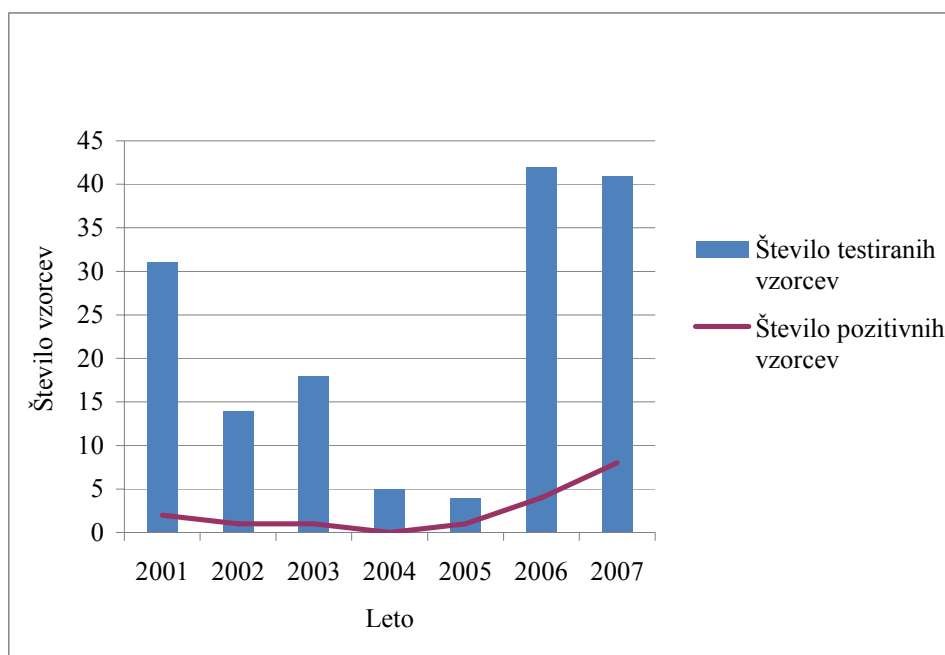
NT - ni testirano

4.1 ŠTEVILO POTRJENIH SAPOVIRUSNIH OKUŽB PO LETIH

Na sapoviruse smo testirali 41 vzorcev iztrebkov iz leta 2007. V 8/41 vzorcev smo dokazali RNA sapovirusov. Prav tako smo testirali 42 vzorcev iz leta 2006. V 4/42 vzorcih so bili prisotni sapovirusi. Iz leta 2005 smo testirali 4 vzorce, od katerih smo sapoviruse dokazali le v 1 od 4 vzorcev. Vseh 5 testiranih vzorcev iz leta 2004 je bilo negativnih na sapoviruse. Iz leta 2003 smo testirali 18 vzorcev, sapoviruse smo potrdili le pri 1/18 vzorcev. Iz leta 2002 je bil pozitiven le 1/14 testiranih vzorcev. Od 31 pregledanih vzorcev iz leta 2001 smo pri 2 dokazali sapovirusno RNA.

Preglednica 5: Število pozitivnih vzorcev po posameznih letih.

Leto	Število testiranih vzorcev	Število pozitivnih vzorcev
2001	31	2
2002	14	1
2003	18	1
2004	5	0
2005	4	1
2006	42	4
2007	41	8

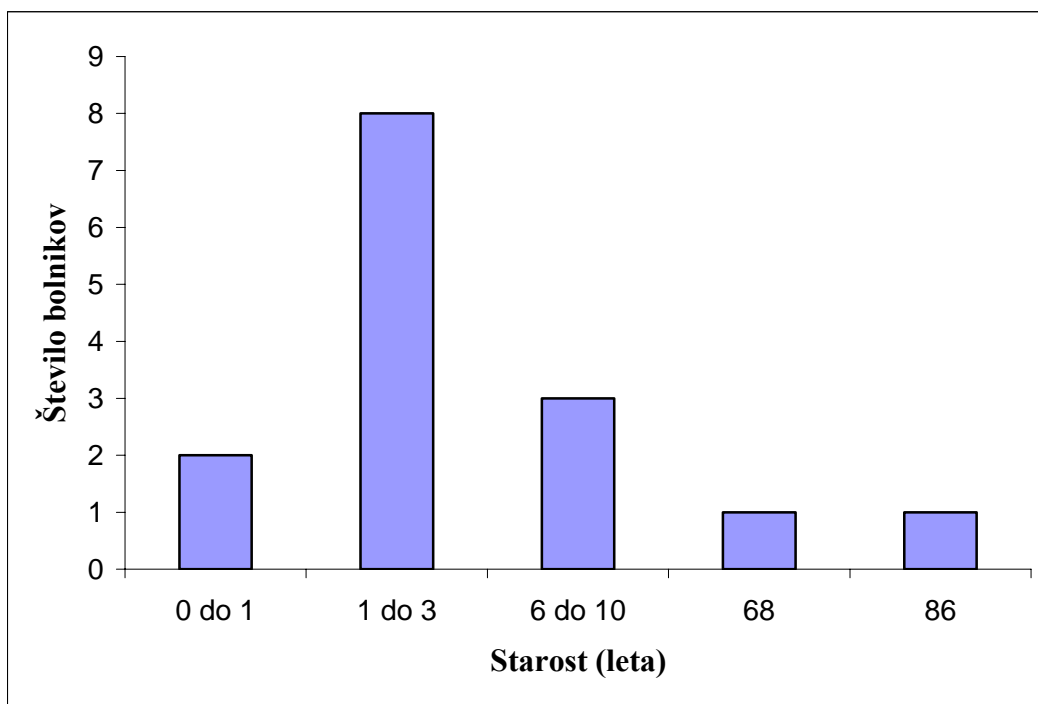


Slika 6: Primerjava števila testiranih vzorcev in števila pozitivnih vzorcev po posameznih letih.

Od 17 pozitivnih vzorcev smo jih največ - 8 - dokazali v letu 2007, 4 v letu 2006, 1 v letu 2005, 1 v letu 2003, 1 v letu 2002 in 2 v letu 2001.

4.2 STAROST BOLNIKOV

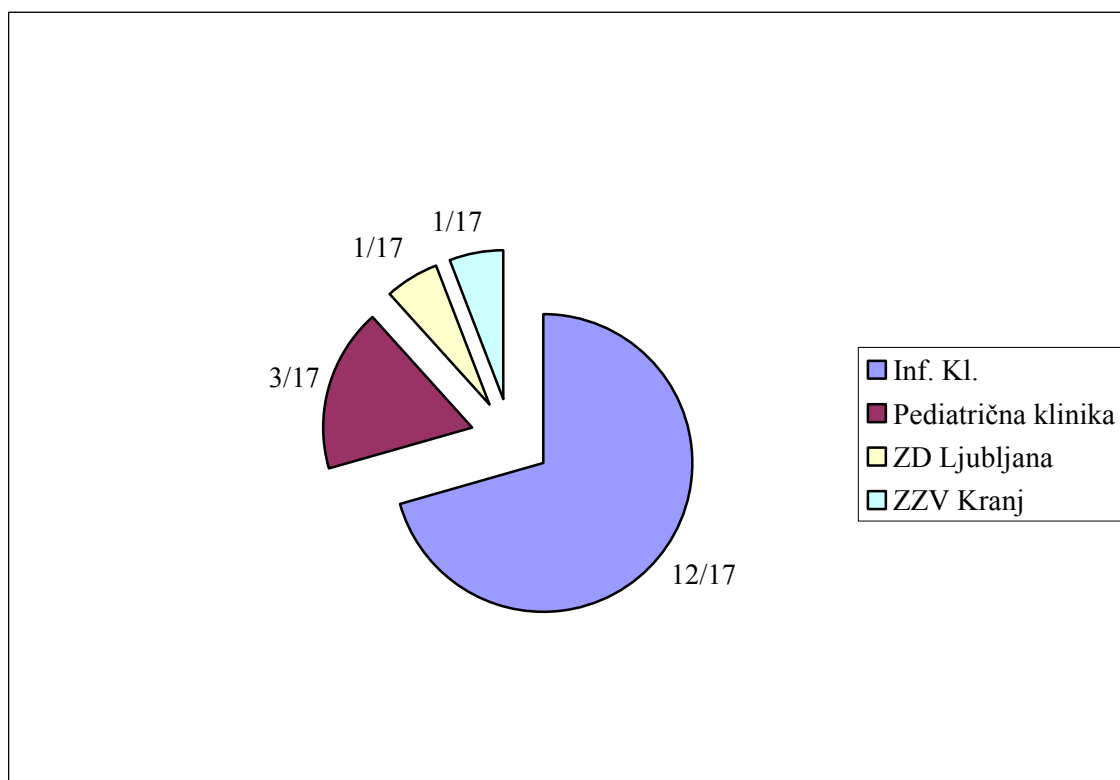
Od vseh bolnikov, pri katerih smo dokazali sapovirusno okužbo, sta bila dva bolnika stara manj kot 1 leto, 8 bolnikov je bilo starih od 1 do 3 let, 3 bolniki so bili stari od 6 do 10 let, en bolnik je bil star 68 in en 86 let. Za enega bolnika nismo imeli podatka o starosti.



Slika 7: Starostna porazdelitev bolnikov s sapovirusno okužbo v Sloveniji v letih od 2001 do 2007.

4.3 POŠILJATELJI VZORCEV IZTREBKOV, V KATERIH SO BILI PRISOTNI SAPOVIRUSI

Od vseh vzorcev, kjer smo dokazali sapovirusno RNA, smo jih največ, to je 12 vzorcev, dobili iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, 3 vzorce iz Pediatrične klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, 1 vzorec iz Zdravstvenega doma v Ljubljani (ZD Ljubljana) in 1 vzorec iz Zavoda za zdravstveno varstvo Kranj (ZZV Kranj).



Slika 8: Delež vzorcev iztrebkov, v katerih smo dokazali sapoviruse, iz posameznih zdravstvenih ustanov.

4.4 SEKVENIRANJE POLIMERAZNEGA GENA

Sekvenirali smo 5 vzorcev, pri katerih smo dobili pozitiven rezultat pri pomnoževanju dela polimeraznega gena. Eden od vzorcev je pripadal genski skupini I, genotipu 1 (GI.1), dva genski skupini I, genotipu 2 (GI.2) in dva genski skupini II, genotipu 2 (GII.2).

4.5 SEKVENIRANJE KAPSIDNEGA GENA

Trije od desetih sekveniranih vzorcev so pripadali genski skupini I in genotipu 1 (GI.1), 4 genski skupini I, genotipu 2 (GI.2), 1 genotipu II, genski skupini 1 (GII.1) in 2 genski skupini II in genotipu 2 (GII.2).

4.6 NEOPREDELJENI VZORCI

V 88 vzorcih smo z elektronskim mikroskopom določili kaliciviruse, vendar pa v njih nismo uspeli dokazati norovirusov ali sapovirusov. Največ takih vzorcev je bilo iz let 2001 in 2006 (25 vzorcev), najmanj v letih 2005 (2), 2007 (3) in 2004 (5). Leta 2002 je bilo 13 takih vzorcev, leta 2003 pa 15. V 44 vzorcih iz let 2005 do 2007, v katerih smo z elektronskim mikroskopom določili MOV, prav tako nismo dokazali sapovirusov ali norovirusov.

4.7 PRIMERJAVA ŠTEVILA SAPOVIRUSNIH OKUŽB GLEDE NA NOROVIRUSNE OKUŽBE V LETU 2007

Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije je bilo v letu 2007 prijavljenih 1360 kalicivirusnih drisk. Povzročitelji večine kalicivirusnih drisk so bili norovirusi, ker v Sloveniji diagnostike sapovirusov še ne izvajamo. Od 41 vzorcev iz leta

2007, vključenih v diplomsko nalogo, ki so bili z elektronskim mikroskopom morfološko določeni kot kalicivirusi in pri katerih smo tudi z molekularnimi metodami ovrgli sum na noroviruse, smo pri 8. vzorcih potrdili sapoviruse z reakcijo RT-PCR, 6 vzorcev pa smo tudi sekvenirali.

5 RAZPRAVA

S to raziskavo smo ugotovili da so se tudi v Sloveniji v letih 2001 do 2007 pojavljale okužbe s sapovirusi. Zajeli smo 155 vzorcev iztrebkov bolnikov s kalicivirusnim gastroenteritisom, pri katerih v iztrebkih nismo dokazali norovirusov. Ugotovili smo, da so bili pri 17/155 primerov neidentificiranih kalicivirusnih okužb povzročitelj sapovirusi. V 6/155 vzorcev smo z molekularnimi metodami (RT-PCR) potrdili noroviruse. V 132/155 vzorcev smo z elektronskim mikroskopom določili kaliciviruse ali male okrogle viruse vendar pa v njih z molekularnimi metodami nismo potrdili sapovirusov ali norovirusov. Kot je prikazano v rezultatih (Preglednica 5), je bilo največje število pozitivnih vzorcev iz leta 2007 (8 vzorcev). Vzrok za povečano število pozitivnih rezultatov v letu 2007 je najverjetneje večje število pregledanih vzorcev (41 vzorcev). Tudi iz leta 2006 smo pregledali skoraj enako število vzorcev, vendar smo sapoviruse določili le v 4 vzorcih. Pri starejših vzorcih bi bil lahko vzrok za manjše število pozitivnih rezultatov razgrajena ali poškodovana RNA, ki se ni pomnožila.

Dejansko se število pregledanih vzorcev po letih zelo razlikuje, zato nismo mogli narediti primerjave med njimi. Slika 6 je zato samo informativne narave.

Največ bolnikov, okuženih s sapovirusi, je bilo starih do 3 let (10 oseb), trije bolniki so bili stari od 6 do 10 let, dva pa sta bila starejša od 68 let. Podatki sovpadajo z raziskavami po svetu. Okužbe s sapovirusi so najpogostejše pri otrocih, mlajših od 5 let. Občasno se okužbe s sapovirusi pojavijo pri starejših, vendar le redko pri mlajših od 65 let (Gallimore in sod., 2006). En vzorec, v katerem smo dokazali sapovirusno RNA, smo dobili od dojenčka, starega le 1 mesec. V tem primeru materina protitelesa očitno niso dajala zadostne zaščite otroku pred okužbo (Numata in sod., 1997) ali pa mati ni imela protiteles.

Za enega bolnika, ki je bil del prvega znanega s sapovirusi povzročenega izbruha gastroenteritisa v Sloveniji, nismo imeli podatka o starosti. Vzorec je bil leta 2002 vzet prebivalcu gorenjske vasi in na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske

fakultete Univerze v Ljubljani poslan iz Zavoda za zdravstveno varstvo s sumom na noroviruse.

Po podatkih iz objav, izbruhi sapovirusnega gastroenteritisa niso tako pogosti, kot izbruhi norovirusnega gastroenteritisa, okužbe s sapovirusi se večkrat pojavijo kot sporadični primeri (Hansman in sod., 2007d). Tudi v naši raziskavi smo naključno odkrili le en sam izbruh sapovirusnega gastroenteritisa, ostali primeri so predstavljali sporadične okužbe. Predvidevamo, da bi verjetno lahko tudi nekaj sporadičnih primerov povezali z izbruhi z boljšim sodelovanjem lečečega zdravnika, epidemiologa in mikrobiologa. Največ sporadičnih vzorcev, v katerih smo določili sapovirusno RNA, je bilo poslanih iz Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, ostali vzorci so bili poslani iz Pediatrične klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in Zdravstvenega doma v Ljubljani. Glede na to, da se večinoma vsi otroci okužijo s sapovirusi do 5 leta starosti (Hansman in sod., 2007b) in ker je veliko okužb asimptomatskih (Farkas in sod., 2000), so bili poslani vzorci verjetno od oseb s hujšim potekom bolezni, ki so potrebovali oralno ali intravensko rehidracijo ali od bolnikov z drugo primarno boleznijo, ki so se okužili tik pred prihodom v bolnišnico ali pa v bolnišnici. Predvidevamo, da je bilo sapovirusnih okužb dejansko veliko več.

S sekveniranjem vzorcev smo dokazali, da so najpogostejši sapovirusi genske skupine I (GI). Ta naj bi tudi sicer predstavljala prevladujočo gensko skupino drugod po svetu (Hansman in sod., 2007b). Pri sekveniranju dela kapsidnega gena smo 7 od 10 vzorcev uvrstili v GI, ostale 3 pa v GII. Pri sekveniranju dela gena za virusno polimerazo so 3 od 5 sekveniranih vzorcev pripadali GI, ostala 2 pa GII. V študiji v Veliki Britaniji, ki je zajemala vzorce s sapovirusi, zbrane od leta 1989 do 2004 so dokazali gensko skupino I, genotip 1 (GI.1) v 61 % vzorcev bolnikov okuženih s sapovirusi (Gallimore in sod., 2006). V naši raziskavi smo GI.1 dokazali v 30 % vzorcev.

V naši raziskavi se je genotip, pri vseh vzorcih pri sekveniranju kapsidnega in polimeraznega gena, ujema. To pomeni, da je okužbo povzročil en sev sapovirusov in da med sapovirusnimi sevi ni bilo rekombinantnih (Katayama in sod., 2004). V svetu so že poročali o rekombinacijah med dvema genotipoma sapovirusov, ki pripadata isti genski

skupini, GII. Do rekombinacije med dvema virusoma iz iste genske skupine je prišlo na stiku polimeraznega in kapsidnega gena na ORF 1 (Katayama in sod., 2004).

Zaradi prvih poročil o rekombinacijah med genskimi skupinami ter strukturno-genomske podobnosti med sapovirusi in živalskimi kalicivirusi lahko sklepamo na možnost pojava zoonoz. Človeški sapovirusi so filogenetsko sorodni prašičjim kalicivirusom, kar potrjuje možnost obstoja potencialnega živalskega rezervoarja in medvrstnega prenosa (Chen in sod., 2004). Živalski kalicivirusi lahko okužijo druge vrste. Znan je primer okužbe laboratorijskega delavca s kalicivirusom, ki okuži morske leve (San Miguel Sea Lion virus), (Smith in sod., 1998). Tudi rekombinacije med genskimi skupinami se zgodijo na stiku polimeraznega in kapsidnega gena na ORF1. Prvič je rekombinacije med genskima skupinama GII in GIV opisal Hansman s sodelavci leta 2005 (Hansman in sod, 2005b).

Glede na majhno število sekveniranih vzorcev, 5 za polimerazni in 10 za kapsidni gen, so bili ti precej genetsko raznoliki. Pripadali so 4 različnim genotipom (GI.1, GI.2, GII.1, GII.2).

V raziskavi kar v 88 od 110 vzorcev nismo dokazali sapovirusov, čeprav smo z elektronskim mikroskopom določili kaliciviruse in izključili noroviruse. Izbrana molekularna metoda je v teh primerih lahko neuspešna, saj pri starejših vzorcih obstaja možnost, da se je RNA poškodovala ali pa so jo razgradile RNaze. Možno je tudi, da smo v postopku osamitve poškodovali RNA ali pa je bila osamitev neuspešna. Morda bi morali za pomnoževanje uporabiti manj specifične začetne oligonukleotide, da bi dobili pozitiven rezultat. Ker smo reakcijo RT-PCR za sapoviruse šele začeli izvajati je možno, da ni bila dovolj optimizirana in se zato želen del RNA ni pomnožil. V vzorcu bi bilo lahko preveč inhibitorjev reakcije RT-PCR, ki preprečujejo pomnoževanje RNA. Lahko pa bi imeli sapovirusi na našem področju tudi drugačne genske značilnosti in zato začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje ne morejo nalegati na njihov genom.

Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije je bilo v letu 2007 prijavljenih 1360 norovirusnih drisk (Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije, 2008). V naši raziskavi smo v 8 vzorcih iz leta 2007 potrdili sapoviruse. Delež

sapovirusnih okužb v tem letu je bil zelo majhen in znaša manj kot 1 %, kar gotovo ne odraža dejanskega stanja zaradi velikega števila asimptomatskih, neprijavljenih in laboratorijsko nepojasnjenih okužb.

Tudi po podatkih iz drugih držav je stopnja okužb z norovirusi bistveno večja kot s sapovirusi, vendar se ne razlikuje toliko, kot po naših podatkih. Na Nizozemskem so leta 1999 od vseh prijavljenih primerov gastroenteritisa odkrili 11 % norovirusnega in 2 % sapovirusnega gastroenteritisa (de Witt in sod., 2003). Na Finskem so v 2-letni raziskavi, ki je zajemala približno 2400 otrok do 2 let starosti, opisali, da so med kalicivirusi, norovirusi povzročitelji 20 % okužb in sapovirusi 9 % okužb. V Mehiki so v kohortni raziskavi, v katero so vključili vzorce iztrebkov od leta 1989 do 1991, ugotovili, da je delež sapovirusnih gastroenteritisov, glede na vse kalicivirusne gastroenteritise, pri otrocih do 2 let veliko večji. Znaša kar 40 %, delež norovirusnih gastroenteritisov pa 60 % (Farkas in sod., 2000).

V naši raziskavi smo ugotovili, da povzročajo sapovirusi pri slovenski populaciji okužbe v razmeroma majhnem odstotku. Retrogradno smo ugotovili večjo prisotnost sapovirusov med obolelimi v izbruhu na Gorenjskem, zato menimo, da bi bilo smiselno vpeljati testiranje na sapoviruse vsaj v primeru izbruhov pri bolnikih z gastroenteritisom, kjer norovirusi niso dokazani, predvsem pa pri obolelih otrocih do 10. leta starosti in osebah starejših od 68 let.

6 SKLEPI

- V raziskavi smo dokazali, da se v Sloveniji pojavljajo okužbe s sapovirusi. Podobno kot drugod po svetu predstavljajo le manjši delež vseh kalicivirusnih okužb. Tudi pri nas je delež norovirusnih okužb veliko večji.
- Ker je veliko sapovirusnih okužb blažjih ali asimptomatskih in zato nesledljivih, iz raziskave ne moremo sklepati na dejansko število sapovirusnih okužb.
- Pokazali smo, da sapovirusi v Sloveniji okužijo predvsem otroke do 10 leta starosti in osebe starejše od 68 let.
- V Sloveniji se pojavljajo predvsem sporadični primeri okužb s sapovirusi. Izbruh, ki smo ga odkrili, je prvi znan izbruh sapovirusnega gastroenteritisa v Sloveniji.
- S sekveniranjem smo dokazali genetsko raznolikost sapovirusov. Pri sekveniranju smo dokazali 4 različne genotipe (GI.1, GI.2, GII.1, GII.2). Ker so se genotipi pri sekveniranju polimeraznega in kapsidnega gena ujemali, sklepamo, da ni prišlo do rekombinacije virusnih genomov.
- Dokazali smo, da v Sloveniji prevladuje genska skupina GI, kar se ujema s podatki iz drugih držav.
- 132 primerov okužb s kalicivirusi in malimi okroglimi virusi je ostalo nepojasnjenih.

7 POVZETEK

V raziskavi smo želeli ugotoviti vlogo sapovirusov kot povzročiteljih gastroenteritičnih okužb v Sloveniji od leta 2001 do leta 2007. Pregledali smo 155 izbranih vzorcev iztrebkov bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom. Vzorci so bili pregledani z metodami neposredne elektronske mikroskopije. V njih so bili dokazani kalicivirusi. Reakciji RT-PCR in EIA nista potrdili norovirusov.

Sapovirusno RNA smo osamili z dvema metodama: s TRIzolom ali s komercialnim kompletom (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN). V 17 od 155 vzorcev smo dokazali sapoviruse z reakcijo RT-PCR. Uporabili smo tri različne pare začetnih oligonukleotidov. Začetna oligonukleotida SR80/JV33 za pomnoževanje dela polimeraznega gena vseh znanih sapovirusnih genotipov; SLV5317 in SLV5749 za pomnoževanje dela sapovirusnega kapsidnega gena in manj specifična začetna oligonukleotida P289/P290, ki pomnožujeta tako del sapovirusnega, kot tudi norovirusnega polimeraznega gena. Pri sekveniranju določenega števila vzorcev smo ugotovili, da so ti pripadali 4 različnim sapovirusnim genotipom. Ugotovili smo, da se najpogosteje pojavlja genska skupina GI in da v nobenem od vzorcev ni prišlo do virusne rekombinacije. Z raziskavo smo potrdili, da so za sapovirusno okužbo dovzetni predvsem otroci do 5. leta starosti in starejši ljudje (nad 65 let). Ugotovili smo, da je delež sapovirusnih gastroenteritisov, v primerjavi z norovirusnimi gastroenteritisi, mnogo manjši. Dokazali smo prvi znan primer izbruha gastroenteritisa, povzročenega s sapovirusi, v Sloveniji.

Sapoviruse smo dokazali v 17 od 155 izbranih pregledanih vzorcev. To število se zdi majhno, glede na to, da smo pregledali vzorce, v katerih bi bili lahko prisotni sapovirusi iz obdobja 7 let. Zavedati se moramo, da je veliko število sapovirusnih okužb asimptomatskih, ali pa so blažje in hitro minejo. Bolniki zaradi take okužbe največkrat ne obiščejo zdravnika. Število sapovirusnih okužb je zato verjetno veliko večje. Ker pa so tudi asimptomatski bolniki in bolniki z lažjim potekom bolezni prenašalci virusa, moramo vedno skrbeti za osebno higieno (predvsem rok). Na to morajo biti še dodatno pozorne predvsem osebe, ki delajo s hrano in z ljudmi (npr. v bolnišnicah). Potrebne bi bile še

nadaljnje raziskave, ki bi vzporedno spremljale prisotnost sapovirusov v primerjavi z najpogostejšimi povzročitelji gastroenteritisa, rotavirusi in norovirusi.

8 VIRI

Akihara S., Phan T.G., Nyugen T.A., Tagyu F., Okitsu S., Muller W.E., Ushijama H. 2005. Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. *Journal of Medical Virology*, 77: 595-601

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

Chen R., Neill J.D., Estes M.K., Venkatram Prasad B.V. 2006. X-ray structure of native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 8048-8053

Chen R., Neill J.D., Noel J.S., Hutson A.M., Glass R.I., Estes M.K., Venkataram Prasad B.V. 2004. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *Journal of Virology*, 78: 6469-6479

de Witt M.A.S., Koopmans M.P.G., van Duynhoven T.H.P. 2003. Risk factors for norovirus, sapporo-like virus and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 1563-1570

Farkas T., Jiang X., Guerrero M.L., Zhong W., Wilton N., Berke T., Matson D.O., Pickering L.K., Ruiz-Palacios G. 2000. Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children. *Journal of Medical Virology*, 62: 217-223

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

Farkas T., Deng X., Ruiz-Palacios G., Morrow A., Jiang X. 2006. Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3674-3679

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

Gallimore C.I., Iturriza-Gomara M., Lewis D., Cubitt D., Cotterill H., Graj J.J. 2006. Characterization of sapoviruses collected in the United Kingdom from 1989 to 2004. *Journal of Medical Virology*, 78: 673-682

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., 1997. The role of human caliciviruses in epidemic gastroenteritis. *Archives of Virology*, 13: 153-165

Green K.Y. 2007. *Caliciviridae: The Noroviruses*. V: *Fields' virology*. Vol. 1. 5th ed. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 950-979

Hansman G.S., Natori K., Oka T., Ogawa S., Tanaka K., Nagata N., Takeda N., Katayama K. 2005a. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Archives of Virology*, 150: 21-36

Hansman G.S., Takeda N., Oka T., Oseto M., Hedlund K.O., Katayama K. 2005b. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 1916-1920

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., Katayama K., Takeda N. 2007c. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination and classification. *Reviews in Medical Virology*, 17: 133-141

Hansman G.S., Saito H., Shibata C., Ishizuka S., Oseto M., Oka T., Takeda N. 2007d. Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1347-1349

Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. 2008. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v letu 2007: letno poročilo. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 102 str.

Jiang, X., Huang, P.W., Zhong, W.M., Farkas, T., Cubitt, D.W., Matson, D.O., 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 8: 145-154.

Katayama K., Miyoshi T., Uchino K., Oka T., Tanaka T., Takeda N., Hansman G.S. 2004. Novel recombinant sapovirus. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 1874-1876

Kohli E., Bon F., Balay K., Pothier P. 2005. Human caliciviruses, a major cause of acute gastroenteritis. *Virologie*, 9: 63-106

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

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

Ludert E.L., Alcalá A.C., Liprandi F. 2004. Primer pair p289-p290, designed to detect both noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR, also detects rotaviruses by cross reactivity. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 835-836

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

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

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

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

Okada M., Yamashita Y., Oseto M., Ogawa T., Kaiho I., Shinozaki K. 2006b. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes*, 33: 157-161

Parashar U., Quiroz E.S., Mounts A.W., Monroe S.S., Fankhauser 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., Nguyen T.A., Nishimura S., Nishimura T., Yamamoto A., Okitsu S., Ushijima H. 2005a. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: Virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Archives of Virology*, 150: 1415-1424

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

Phan T.G., Trinh Q.D., Yagyu F., Okitsu S. 2007. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26: 21-27

Smith A.W., Skilling D.E., Cherry N., Mead J.H., Matson D.O. 1998. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerging Infectious Diseases*, 4: 13-20

Vasickova P., Dvorska L., Lorencova A., Pavlik I. 2005. Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Veterinary Medicine*, 50: 89-104

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

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

White P. 2006. Genetic diversity of sapovirus in children, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 141-143

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

ZAHVALA

Za strokovno pomoč pri nastanku diplome in pri laboratorijskem delu se zahvaljujem somentorici, dr. Mateji Poljšak-Prijatelj in delovni mentorici, Janet Zimšek-Mijovski.

Za mentorstvo se zahvaljujem prof. dr. Mariu Poljaku, za recenzijo pa prof. dr. Tatjani Avšič-Županc.

Za podporo med študijem in pomoč pri popravi diplomske naloge se zahvaljujem svojim staršem, Janu in Mariji Kobal.

Nazadnje pa se zahvaljujem prijateljem za vse trenutke prostega časa, ki so mi dali energijo za študij in nenazadnje tudi za diplomsko delo.