



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET NOVI SAD
DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE
JAVNO ZDRAVLJE

ZNAČAJ MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE U
DOKAZIVANJU VIRUSNOG GASTROINTESTINALNOG
SINDROMA U VOJVODINI

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Vesna Milošević

Kandidat: Asist. dr Aleksandra Patić

Novi Sad, 2017. godina

Lista skraćenica

AIDS - Sindrom stečene imunodeficijencije (Acquired immune deficiency syndrome)

Ag – Antigen

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

bp - Bazni parovi

CAR - Koksaki i adenovirusni receptor (Coxsackievirus adenovirus receptor)

CDC - Centar za prevenciju i kontrolu bolesti (Centers for Disease Control and Prevention)

DLP - Dvoslojna rotavirusna čestica

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP – dezoksinukleotid trifosfat

ddNTP - dideoksinukleotid trifosfat

HAstV - Humani astrovirusi

HAstV-MLB - Humani astrovirusi-Melburn

HAstV-VA/HMO - Humani astrovirusi-Virdžinija/ skraćenica za ljude, kune i ovce

ELISA – Imunoenzimski test (Enzyme-linked immunosorbent assay)

HAdV - Humani adenovirusi

ICTV - Međunarodni Savet za Taksonomiju Virusa (International Committee on Taxonomy of Viruses)

IgA - Imunoglobulin A

iRNK - Informaciona RNK

ITR - Ponavljajući obrnuti sled (Inverted terminal repeat)

kb – kilobaza

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MLP – Glavni kasni promoter (Major late promoter)

NCBI - National Center for Biotechnology Information, Nacional Institutes

NoV - Norovirus

NoV GI - Norovirus genogrupa I

NoV GII - Norovirus genogrupa II

NC - Negativna kontrola

NSP – Netrukturni proteini

ORF - Otvoreni okvir za čitanje (Open reading frame)

PCR - Reakcija lančane polimerizacije (Polymerase chain reaction)

qPCR - Kvantitativna PCR metoda (Quantitative polymerase chain reaction)

RdRp - RNK zavisna RNK polimeraza (RNA-dependent RNA polymerase)

RNK - Ribonukleinska kiselina

RT-PCR - Reverzna transkripcija lančane reakcije polimerizacije

RV – Rotavirusi

RVA - grupa A rotavirusa

SAD - Sjedinjene Američke države

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

TLP - Troslojna rotavirusna čestica

TP - Terminalni protein (Terminal protein)

VA RNA - virusna ribonukleinske kiselina (virus associated-ribonucleic acid)

VLP – Virusima slične čestice

VP – Virusni proteini

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Aleksandra Patić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Vesna Milošević redovni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Značaj molekularne dijagnostike u dokazivanju virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	(9 poglavlja/ 197 stranica/ 40 slika/19 grafikon/ 49 tabela/ 272 reference/ 2 priloga)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija - Virusologija
Predmetna odrednica, ključne reči:	gastroenteritis + virusologija; rotavirus; norovirus; astrovirus; humani adenovirusi; molekularne dijagnostičke metode; genom
UDK	616.33/.34-022-07(497.113)
Čuva se: ČU	U Biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, 21 000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3.
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	

Uvod: Virusni gastrointestinalni sindrom je aktuelni zdravstveni problem u celom svetu. To važi kako u razvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju, a posebno u nerazvijenim zemljama, gde je drugi po redu uzrok mortaliteta. Nagli početak bolesti, praćen pojavom velikog broja tečnih stolica, mukom, povraćanjem, bolovima u stomaku, temperaturom, malaksalošću, ima za posledicu dehidraciju. U svim starosnim grupama obolelih, a naročito kod sasvim male dece, starih i imunodeficitarnih osoba može da dođe do smrtnog ishoda, ukoliko se brzo ne postavi tačna etiološka dijagnoza bolesti i ne pristupi se odmah nadoknadi vode i elektrolita, kao i primeni svih ostalih mera simptomatske terapije. Brzo postavljena tačna dijagnoza, što se najbolje postiže *real-time PCR* testom, sprečava pojavu komplikacija, pa i fatalnog ishoda bolesti. Istovremeno, omogućava primenu odgovarajućih epidemioloških mera da se spreči nastanak epidemija i njihovo širenje.

Cilj ovog istraživanja bio je da se tačno utvrdi incidenca virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini i učestalost pojave epidemijskog i sporadičnog javljanja ove bolesti. Cilj je bio i postavljanje algoritma za primenu *real-time PCR* testa u dijagnostici virusnog gastrointestinalnog sindroma u budućem radu. Isto tako, cilj je bio da se molekularnom analizom, sekvenciranjem delova genoma pozitivnih uzoraka stolice, izvrši genetska tipizacija i odredi filogenetska pripadnost virusa.

Materijal i metode: Tokom petogodišnjeg istraživanja molekularnim *real-time PCR* testom pregledane su 1003 obolele osobe sa simptomima virusnog dijarealnog sindroma, starosti od mesec dana do preko 90 godina. Pregledani su na rota, noro, astro i enterične adenoviruse. Na osnovu podataka iz anketnih upitnika i istorija bolesti, detaljno su analizirani svi klinički pokazatelji (javljanje bolesti tokom godine, trajanje bolesti, simptomi). Procena težine kliničke slike vršena je prema Vesikari skali. Svi podaci su upoređivani prema vrsti virusnog uzročnika, prema starosti obolelih, godinama trajanja istraživanja i epidemijskom i sporadičnom javljanju oboljenja. Dobijeni podaci su statistički obrađeni, tabelarno i grafički prikazani.

Rezultati: U petogodišnjem periodu *real-time PCR* testom pregledan je uzorak od 1003 obolele osobe različite starosti na 4 virusna uzročnika dijarealnog sindroma (rota, noro, astro i enterične adenoviruse). Virusni dijarealni sindrom dokazan je kod 709 obolelih (70,69%). Najčešće su dokazane rotavirusne infekcije u 28,81%. Statistički značajno najčešće rotavirusi su bili utvrđeni kod dece do 5 godina (38,90%), ali u visokom procentu i kod dece uzrasta 6 do 14 godina (24,83%). Deca mlađa od 5 godina imala su statistički značajno najtežu kliničku sliku, bila su češće hospitalizovana i imala su statistički značajno višu temperaturu. Pored više temperature kod obolelih od rotavirusa, klinička slika je kod ovih bolesnika bila teža i bolest je duže trajala nego kod obolelih od drugih virusa. Norovirusna infekcija je dokazana u 23,03% obolelih i to statistički značajno češće kod odraslih osoba, starijih od 20 godina. Od kliničkih simptoma kod ovih bolesnika statistički značajno češće su dokazani muka, povraćanje i bolovi u stomaku, nego kod obolelih od drugih virusa. Norovirusi su značajno češće bili uzročnici epidemijskog javljanja bolesti. Astrovirus je dokazan kod znatno manjeg broja obolelih (u 2,29%) i to samo kod dece do 5 godina i dece uzrasta 6 do 14 godina. Infekcija izazvana enteričnim adenovirusima dokazana je kod 13,36% bolesnika. Njačešće je utvrđena kod dece uzrasta do 5 godina i 6 do 14 godina. Oboleli od adenovirusa imali su statistički značajno blažu kliničku sliku bolesti. Dva virusna uzročnika u uzorku stolice dokazana su u 3,19% osoba, obično u toku epidemijskog javljanja bolesti. Ovi bolesnici su imali bitno težu kliničku sliku. Najviše obolelih od dijarealnog sindroma bilo je u hladnim mesecima, mada su dijagnostikovani i tokom cele godine. U petogodišnjem periodu utvrđene su 22 epidemije u kolektivima i 9 porodičnih epidemija. Epidemijsko javljanje bolesti bilo je statistički značajno najčešće kod najstarijih bolesnika (starijih od 50 godina), a sporadično javljanje bilo je statistički značajno najčešće kod dece. U cilju potvrde tačnosti dijagnostike virusa u ispitivanim uzorcima *real-time PCR* testom, genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, izabrani su reprezentativni uzorci pozitivni na rota, noro, astro ili adenoviruse. Delovi genoma ovih uzoraka su amplifikovani, a zatim sekvencirani. Sekvencirani izolati rotavirusa pripadali su grupi A i tipovima G1P[8], G2P[4], G3P[8] i G9P[8]. Sekvencirani izolati norovirusa pripadali su genogrubi I tipu 2, zatim genogrubi II tipovima 1, 2, 4 i 17.

Sekvencirani izolati astrovirusa pripadali su grupi klasičnih astrovirusa i tipovima 1, 4 i 5. Sekvencirani izolati adenovirusa pripadali su grupi F i tipovima 40 i 41, kao i grupi C tipu 2. Pripadnost dobijenih sekvenci u ovom istraživanju, dodatno je potvrđena izradom filogenetskog stabla za sekvence pozitivne na rota, noro, astro ili adenoviruse.

Zaključak: Incidenca virusnog dijarealnog sindroma u Vojvodini (70,69%) vrlo je visoka i viša je nego što je bilo pretpostavljeno prilikom prijave teze (u hipotezi). *Real-time PCR* test treba da bude redovno korišćen u budućem dijagnostičkom radu, jer dovodi do brze dijagnostike, čak i ako su virusi prisutni u malom broju u uzorcima tečnih stolica, što je utvrđeno tokom ovog dijagnostičkog rada. Ispitivani virusi treba da budu redovno dijagnostikovani kod obolelih od dijarealnog sindroma i to u svim starosnim grupama, tokom epidemijskog i sporadičnog javljanja oboljenja.

Datum prihvatanja teme od strane Senata:	10.10.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime /titula/zvanje/ naziv organizacije / status) KO	<p>Predsednik: <u>Prof. dr Ivana Hrnjaković Cvjetković</u></p> <p>Član: <u>Prof. dr Aleksandra Knežević</u></p> <p>Član: <u>Dr sci. vet. Tamaš Petrović</u></p> <p>Član: <u>Prof. dr Vladimir Petrović</u></p> <p>Član: <u>Prof. dr Petar Knežević</u></p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D.Thesis
Author: AU	Aleksandra Patić
Mentor: MN	Dr Vesna Milosevic, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Title: TI	Importance of molecular diagnostics in detection of viral gastrointestinal syndrome in Vojvodina
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	Serbian (Latin)/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Author Reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	(9 chapters / 197 pages / 40 figures / 19 graphs / 49 tables / 272 references / 2 priloga)
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Microbiology - Virulogy
Subject, Key words SKW	Gastroenteritis + virology; Rotavirus; Norovirus; Astrovirus; Adenoviruses, Human; Molecular Diagnostic Techniques; Genome
UC	616.33/.34-022-07(497.113)
Holding data: HD	Library of Medical Faculty in Novi Sad, 21 000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	

Introduction: Viral gastrointestinal syndrome is a current ongoing health problem worldwide. This is true of both developed and developing countries, especially underdeveloped ones where it is the second leading cause of mortality. Sudden onset of the disease—accompanied by the occurrence of large numbers of liquid stools, nausea, vomiting, abdominal pain, fever, and exhaustion—leads to dehydration. A fatal outcome can occur in all age groups of patients, especially very young children, the elderly, and the immuno-deficient, unless an accurate etiological diagnosis of the disease is quickly established, followed by a prompt institution of fluid and electrolyte placement, and implementation of other symptomatic therapy measures. Quick establishment of an accurate diagnosis, which is best achieved using the *real-time PCR* test, prevents the onset of complications, including a potentially fatal outcome of the disease. Simultaneously, it enables the implementation of appropriate epidemiological measures to prevent epidemic outbreaks and their spread.

The aim of this study was to accurately determine the incidence of viral gastrointestinal syndrome in Vojvodina and the frequency of epidemic and sporadic occurrence of this disease. The aim was also to set up an algorithm for the application of the *real-time PCR* test in diagnostics of viral gastrointestinal syndrome in future work. Likewise, the aim was to carry out genetic typing and determine phylogenetic affiliation of the virus using molecular analysis and sequencing of parts of genomes from positive stool samples.

Material and Methods: During a five-year study, 1003 patients with symptoms of viral diarrheal syndrome, aged from one month to more than 90 years old, were examined using molecular *real-time PCR* test. They were screened for rota, noro, astro, and enteric adenoviruses. Based on the data from survey questionnaires and medical case history, all clinical indicators were meticulously analyzed (disease occurrence during the year, disease duration, symptoms). The assessment of the clinical severity was carried out according to the Vesikari Clinical Severity Scoring scale. All data were compared according to the type of the viral causing agent, age of the patients, duration of research in years, and epidemic and sporadic occurrence of the disease. Obtained data were statistically analyzed, tabulated, and graphically displayed.

Results: In a five-year period, a sample of 1003 patients of different ages was screened for four different viral causing agents of diarrheal syndrome (rota, noro, astro, and enteric adenoviruses) using the *real-time PCR* test. Viral diarrheal syndrome was confirmed in 709 patients (70.69%). The most commonly found were rotavirus infections in 28.81% of the cases. Rotaviruses were statistically significantly most common in children younger than 5 years old (38.90%), but were also found in high percentage in children aged 6-14 years old (24.83%). Children under 5 years of age had statistically significantly highest clinical severity and fever, and were more frequently hospitalized. In addition to higher fever in patients with rotavirus, clinical severity in these patients was also higher, and the disease lasted longer than in patients with other viruses. Norovirus infections were reported in 23.03% of the subjects, statistically significantly more frequently in adults over 20 years of age. Regarding the clinical symptoms in these patients, nausea, vomiting, and abdominal pain were statistically significantly more common than in patients with other viruses. Noroviruses were significantly more common as causing agents of epidemic disease outbreaks. Astrovirus was found in a significantly smaller number of patients (in 2.29%), and only in children under 5 years of age and children aged 6-14 years old. Enteric adenovirus infections were reported in 13.36% of the subjects. They were most commonly found in children younger than 5, and those aged 6- 14 years old. Adenovirus sufferers had statistically significantly milder clinical disease. Two viral causing agents in the stool sample were found in 3.19% of the subjects, usually during an epidemic disease outbreak. These patients had a significantly more severe clinical disease. Highest numbers of sufferers from diarrheal syndrome occurred during the cold months, although they were diagnosed throughout the year. In a five-year period, 22 epidemics in collective groups and 9 family epidemics were identified. Epidemic outbreaks of the disease were statistically significantly most frequent in the elderly patients (older than 50), while sporadic occurrences were statistically significantly most frequent in children. Representative samples positive for rota, noro, astro, or adenoviruses were selected in

order to confirm the accuracy of virus diagnostics in samples tested by the real-time PCR test, and perform genotyping as well as more detailed molecular analyses. Parts of the genomes of these samples were amplified and then sequenced. Sequenced rotavirus isolates belonged to group A and types G1P[8], G2P[4], G3P[8], and G9P[8]. Sequenced norovirus isolates belonged to genogroup I type 2, and genogroup II types 1, 2, 4, and 17. Sequenced astrovirus isolates belonged to the group of classical astroviruses and types 1, 4, and 5. Sequenced adenovirus isolates belonged to group F and types 40 and 41, as well as group C type 2. The affiliation of the obtained sequences in this study was further confirmed by creating a phylogenetic tree for sequences positive for rota, noro, astro, or adenoviruses.

Conclusion: The incidence of viral diarrheal syndrome in Vojvodina (70.69%) is very high—higher than what was assumed at the time of the thesis submission (in the hypothesis). The *real-time PCR* test should be regularly used in future diagnostic work, since it leads to rapid diagnostics even if viruses are present in small numbers in liquid stool samples, as determined in the course of this diagnostic study. The investigated viruses should be regularly tested in patients with diarrheal syndrome belonging to all age groups during both epidemic and sporadic occurrences of the disease.

Accepted on Senate on: AS	10.10.2014.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: <u>Prof. dr Ivana Hrnjaković Cvjetković</u></p> <p>Member: <u>Prof. dr Aleksandra Knežević</u></p> <p>Member: <u>Dr sci. vet. Tamaš Petrović</u></p> <p>Member: <u>Prof. dr Vladimir Petrović</u></p> <p>Member: <u>Prof. dr Petar Knežević</u></p>

Nakon završenog istraživačkog rada i izrade doktorske disertacije, zahvaljujem se na pomoći, pruženoj podršci i saradnji svom mentoru prof. dr Vesni Milošević.

Zahvalnost na stručnim savetima, sugestijama i pomoći dugujem i članovima komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije prof. dr Ivani Hrnjaković Cvjetković, prof. dr Aleksandri Knežević, đp cju. vem. Tamauu Pemposuđu, prof. dr Vladimiru Petroviću i prof. dr Petru Kneževiću.

Zahvalna sam dragim kolegama biologima Milanu Đilasu i Vesni Kukučki na savetima i pomoći oko izvođenja eksperimentalnog rada u okviru molekularne dijagnostike. Zahvalnost dugujem i dr sci. biol. Gordani Kovačević na stručnoj pomoći i savetima oko filogenetske analize dobijenih virusnih izolata.

Veliku zahvalnost dugujem dipl. inženjeru Zoranu Topalovu na svestranoj pomoći oko statističke obrade podataka.

Zahvalna sam kolektivu Centra za virusologiju i kolektivu Centra za kontrolu i prevenciju bolesti, čija mi je saradnja mnogo značila.

Veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici na bezgraničnom razumevanju, ljubavi i podršci.

Sadržaj

VIRUSNI GASTROINTESTINALNI SINDROM	
1.0. Sagledavanje problema	1
1.1. Učestalost, simptomi i komplikacije	2
1.2. Neophodnost brze dijagnostike	3
1.3. Neophodnost brzog sprovođenja terapijskih postupaka i preventivnih-protivepidemijskih mera	4
2.0. Vrste virusnih uzročnika gastrointestinalnog sindroma	6
2.1. Rotavirus	7
2.1.1. Morfologija i struktura rotavirusa	7
2.1.2. Replikacija rotavirusa	11
2.1.3. Klasifikacija i raznovrsnost rotavirusa	12
2.1.4. Otpornost rotavirusa	14
2.1.5. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike rotavirusne infekcije	14
2.1.6. Vakcinacija protiv rotavirusa	15
2.2. Norovirus	16
2.2.1. Morfologija i struktura norovirusa	16
2.2.2. Replikacija norovirusa	18
2.2.3. Klasifikacija i raznovrsnost norovirusa	20
2.2.4. Otpornost norovirusa	21
2.2.5. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike norovirusne infekcije	21
2.3. Astrovirus	24
2.3.1. Morfologija i struktura astrovirusa	24
2.3.2. Replikacija astrovirusa	26
2.3.3. Klasifikacija i raznovrsnost astrovirusa	27
2.3.4. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike astrovirusne infekcije	28
2.4. Enterični adenovirusi	29
2.4.1. Morfologija i struktura adenovirusa	29
2.4.2. Replikacija adenovirusa	31
2.4.3. Klasifikacija i raznovrsnost adenovirusa	32
2.4.4. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike adenovirusne infekcije	33
2.5. Virusi od diferencijalno dijagnostičkog značaja	34
3.0. Postupci i mere pri sporadičnom i epidemijkom javljanju bolesti	37
3.1. Prevencija nastanka virusnog gastrointestinalnog sindroma prema preporukama SZO	37
3.2. Dijagnostika	38
3.3. Terapija	43
3.4. Sporadično i epidemijsko javljanje virusnog dijarealnog sindroma	45
4.0. Ciljevi i hipoteze istraživanja	48
5.0. Materijal i metode	49
5.1. Materijal	49
5.1.1. Grupa za istraživanje	49

5.1.2. Uzorak	50
5.1.3. Anketni upitnik	51
5.2. Metode	51
5.2.1. Metode lančane reakcije polimeraze (PCR)	51
5.2.1.1. Priprema uzorka	51
5.2.1.2. Izolacija nukleinskih kiselina	51
5.2.1.3. Identifikacija virusnih uzročnika real-time PCR metodom	52
5.2.1.4. Određivanje genogrupe noro i rotavirusa	53
5.2.2. Metode određivanja nukleotidnih sekvenci	53
5.2.2.1. Amplifikacija dela hekson gena kod adenovirusa	53
5.2.2.2. Amplifikacija delova ORF1b i ORF2 kod astrovirusa	54
5.2.2.3. Amplifikacija dela ORF2 kod norovirusa	56
5.2.2.4. Amplifikacija gena 9 (VP7) i gena 4 (VP4) kod rotavirusa	57
5.2.2.5. Prečišćavanje PCR produkata	58
5.2.2.6. Sekvenciranje delova genoma ispitivanih virusa	58
5.2.3. Bioinformatička obrada podataka	58
5.3. Određivanje težine kliničke slike kod obolelih	65
5.4. Statistička analiza	66
6.0. Rezultati	67
6.1. Rezultati prikazani prema godinama trajanja istraživanja, vrsti virusnih uzročnika i starosti obolelih	67
6.2. Učestalost javljanja dijarealnog sindroma tokom godine (po mesecima)	84
6.3. Klinički pokazatelji kod obolelih	87
6.4. Procena težine kliničke slike prema Vesikari skali	102
6.5. Podaci o potvrđenim epidemijama virusnih gastroenterokolitisa i sporadičnom javljanju bolesti u petogodišnjem periodu u Vojvodini	107
6.6. Rezultati određivanja genogrupa norovirusa i rotavirusa	113
6.7. Rezultati analize PCR produkata	114
6.8. Rezultati sekvenciranja i filogenetske analize	119
6.8.1. Rezultati sekvenciranja dela hekson gena kod adenovirusa	121
6.8.2. Rezultati sekvenciranja dela ORF2 kod astrovirusa	124
6.8.3. Rezultati sekvenciranja dela ORF2 kod norovirusa	127
6.8.4. Rezultati sekvenciranja gena 4 (VP4) i gena 9 (VP7) kod rotavirusa	131
6.9. Algoritam primene real-time PCR testa u dijagnostici virusnog gastrointestinalnog sindroma	137
7.0. Diskusija	142
8.0. Zaključci	167
9.0. Literatura	169
Prilozi	191

Virusni gastrointestinalni sindrom

1. 0. Sagledavanje problema

Virusni gastrointestinalni sindrom ili virusni gastroenterokolitis se ranije često nazivao nebakterijskim enterokolitisom ili „stomačnim gripom“. Danas se ova akutna dijarealna bolest navodi kao aktuelni problem u celom svetu, pošto je čest uzrok morbiditeta i mortaliteta, kako u razvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju, i to u svim starosnim grupama (1,2). Virusni gastroenterokolitis može imati ozbiljan tok, naročito kod novorođenčadi, male dece, ali i kod odraslih, posebno kod imunokompromitovanih i starih – hroničnih bolesnika (2,3). Prema izveštajima Svetske Zdravstvene Organizacije (iz juna 2011. godine) virusni gastrointestinalni sindrom je naveden kao peti po redu uzrok smrti u svetu (2,46 miliona umrlih u svetu, što iznosi 4,3% od ukupnog broja umrlih). Pri tome, u nerazvijenim zemljama, dijarealni sindrom je čak drugi po redu uzrok mortaliteta (8,2% umrlih), a u srednje razvijenim zemljama je peti po redosledu kao uzrok smrti (4,4% umrlih). Jedino u razvijenim zemljama gastrointestinalni sindrom se ne nalazi među deset najčešćih uzroka smrti (4).

Izveštaj Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) iz 2015. godine navodi da je akutni dijarealni sindrom osmi po redu kao uzrok smrti u svetu (sa 1,3 miliona umrlih u svetu za godinu dana). Pri tome, u nerazvijenim zemljama dijarealni sindrom je drugi po redu uzrok mortaliteta, u srednje razvijenim zemljama je šesti po redu uzrok smrti, a u razvijenim zemljama gastrointestinalni sindrom se ne nalazi među deset najčešćih uzroka mortaliteta, kao što je navedeno i u 2011. godini. Kod dece mlađe od 5 godina dijarealni sindrom je četvrti po redu uzrok smrti u svetu (525 600 dece mlađe od 5 godina umrlo je u svetu za godinu dana). Ako se posmatra situacija u Evropi, izveštaj SZO iz 2015. godine navodi da je kod dece mlađe od 5 godina, dijarealni sindrom šesti po redu uzrok mortaliteta. Naročito je velik rizik za neuhranjenu decu i decu sa poremećajem imuniteta, kao i za sasvim malu decu, mlađu od godinu dana (5). Svi navedeni podaci o učestalosti i mortalitetu dijarealnog sindroma u svetu, posebno kod dece mlađe od 5 godina, pokazuju da je ovo oboljenje i dalje značajan zdravstveni problem.

1.1. Učestalost, simptomi i komplikacije

Podaci iz literature pokazuju da su virusi uzročnici u 30 do 40% slučajeva akutnih proliva (6). Gastroenteritis je odgovoran za više od milion smrtnih slučajeva svake godine, što ga čini jednim od najčešćih uzroka smrtnosti u svetu. Najveća opasnost postoji kod male dece i imunodeficitarnih osoba. Dok se učestalost bakterijskih i parazitaranih gastrointestinalnih infekcija smanjuje, kao posledica primene odgovarajućih preventivnih mera, javljanje virusnog gastroenteritisa se ne smanjuje u zemljama u razvoju, nego je čak u porastu. U razvijenim zemljama virusi su već najčešći patogeni koji uzrokuju dijareju. Dakle, virusni gastrointestinalni sindrom je značajan zdravstveni problem širom sveta (7).

Virusni gastroenterokolitis je zapaljenje sluznice gastrointestinalnog trakta, koje zahvata želudac, creva, a obično i želudac i creva. Virusni oštećuju epitelne ćelije pre svega tankog creva. Dolazi do skraćivanja i atrofije crevnih resica. To dovodi do poremećaja apsorpcije, odnosno, gubitka tečnosti, što prvenstveno izaziva proliv i povraćanje (1). Virusni gastroenterokolitis je praćen prolivom, mučninom, abdominalnim bolovima, kao i povraćanjem. Osnovni simptomi bolesti su proliv i povraćanje. Mogu da budu praćeni i opštim simptomima: glavoboljom, slabošću, povišenom temperaturom, bolovima u mišićima i zglobovima itd. Simptomi se javljaju 4-48 sati nakon infekcije i najčešće traju nekoliko dana, retko do deset dana. Obično se bolest završava ozdravljenjem bez komplikacija. Kod pojedinih osoba, naprimer kod male dece, novorođenčadi, starih i hroničnih bolesnika, kao i kod imunodeficitarnih osoba, može da dođe do dehidracije (gubitka vode i elektrolita) u vrlo kratkom periodu, naročito kod male dece. Pri tome, nastaju komplikacije, pa i mogući smrtni ishod (2). Podaci pokazuju da godišnje u SAD ima između 211 i 373 miliona slučajeva virusnog gastroenterokolitisa. Od toga se više od 900 000 obolelih hospitalizuje, a čak u 6 000 slučajeva dolazi do smrtnog ishoda (8,9). Bitno je blagovremeno prepoznati simptome akutnog virusnog gastroenterokolitisa (Tabela 1) i što brže postaviti tačnu etiološku dijagnozu bolesti.

Tabela 1. Simptomi

Osnovni simptomi	Povremeni simptomi	Vreme javljanja
- vodenasti prolivi (obično bez krvi) - bolovi i grčevi u abdomenu - muka i povraćanje	- povišena temperatura - jeza i slabost - bolovi u mišićima i zglobovima - glavobolja	- 4-48 sati posle ekspozicije - traju od 1-2 dana do 10 dana

Kod novorođenčadi i male dece smrtni ishod može da nastane zbog dehidracije (gubitka vode i elektrolita). Znaci i simptomi dehidracije su: smanjenje i prestanak mokrenja, suve sluzokože, nemogućnost proizvodnje suza, slabost, smanjenje krvnog pritiska. Ukoliko se na vreme ne sprovede rehidracija, simptomatologija se pogoršava. Može se javiti temperatura, krv u stolici, bol u abdomenu itd. (9).

Kod virusnog gastroenterokolitisa infekcije mogu da se javljaju tokom cele godine, za razliku od bakterijskog gastroenterokolitisa, koji ima sezonski karakter (javlja se češće leti). U geografskim područjima sa umerenom klimom virusni gastroenterokolitis najčešće se javlja u hladnim mesecima (jesen, zima i rano proleće), pa se zato i naziva „zimski dijareja“. U tropskim predelima, virusni gastroenteritisi se javljaju tokom cele godine (2,10). Prenosi se infekcija direktnim kontaktom sa inficiranom osobom, kao i preko kontaminirane hrane i vode. Infekcije se javljaju sporadično ili epidemijski. Hranu najčešće kontaminiraju osobe koje je pripremaju, a imaju ovu virusnu infekciju nedijagnostikovanu i blage simptomatologije, kao i zdrave kliconoše, odnosno, osobe koje, nakon akutne bolesti, još neko vreme izlučuju virus u stolici. Često do infekcije dolazi zbog neadekvatnog pranja ruku, ili prilikom pripreme hrane (naprimer povrća, voća i salate), kontaminirane otpadnim ili neispravnim vodama (6,11). Ukoliko su uzročnici akutnog gastroenterokolitisa virusi ili bakterije i paraziti, bolest je kontagiozna. Ako uzrok nisu mikroorganizmi, nego se radi o alergiji na hranu, biotoksinima itd., bolest nije kontagiozna.

1.2 . Neophodnost brze dijagnostike

Zbog mogućih komplikacija, a ponekad i fatalnog ishoda bolesti kod nekih obolelih, najvažnije je da se brzo postavi etiološka dijagnoza.

U dijagnostici virusnih gastroenterokolitisa koriste se metode za direktno dokazivanje virusa i virusnih antigena (Ag) u stolici. Rad na kulturi ćelija, koji se primenjuje isključivo u istraživačke svrhe i to jedino kod rotavirusa, nije upotrebljiv za rutinsku dijagnostiku. Koriste se kao najuspešnije elektronska i imunoelektronska mikroskopija, tehnike sa monoklonalnim antitelima i kao najbolje molekularne metode. Zbog kratkog trajanja bolesti, znatnu prednost u odnosu na ostale dijagnostičke metode, imaju testovi brze i direktne identifikacije uzročnika u uzorcima bolesničkog materijala kao što je *PCR* test (Reakcija lančane polimerizacije - engl. *Polymerase chain reaction*) (12). Osetljivost, pa nekad i specifičnost „brzih testova“ (imunohromatografskih testova ili Elisa testova), kojima se dokazuju virusni antigeni u uzorcima stolice je mnogo manja.

1.3. Neophodnost brzog sprovođenja terapijskih postupaka i preventivnih – protivepidemijskih mera

Bitno je izvršiti brzu dijagnostiku, kako bi se napravila razlika između virusnih i bakterijskih gastroenterokolitisa, koji su česti naročito u zemljama u razvoju (7,10). Nakon isključivanja bakterijskih izročnika dijagnostičkim postupcima, potrebno je da se tačno dokaže virusni uzročnik dijarealnog sindroma. To omogućava primena brzih i preciznih dijagnostičkih metoda, među kojima je jedna od najboljih PCR test. Za virusne uzročnike akutnog gastroenterokolitisa ne postoji specifična (kauzalna) terapija, nego se koristi simptomatsko lečenje. Pre svega je potrebno nadoknaditi tečnost i sprečiti dehidraciju, posebno kod male dece. Naime, ukoliko se na vreme ne preduzmu odgovarajući dijagnostički postupci i ne nadoknade se voda i elektroliti, gastroenterokolitisi virusne etiologije postaju uzrok mortaliteta, pretežno kod male dece (13-15). Smrtni ishod može nastati i kod starih osoba i osoba sa oslabljenim imunitetom (2,16).

Opisani su slučajevi manjih epidemija virusnih gastroenterokolitisa u bolničkim odeljenjima, gde su bili hospitalizovani teži bolesnici (16,17). Međutim, epidemije mogu da se jave i u kolektivima (starački domovi, škole, obdaništa), kao i na turističkim putovanjima (18-24).

Odrasle osobe mogu imati virusni gastroenterokolitis i bez izraženih simptoma. Tada mogu prenositi infekciju izlučivanjem virusa u stolici. Dakle, glavni izvor infekcije kod virusne dijarealne bolesti je čovek. Infekcija se prenosi direktnim kontaktom (fekalno-oralnim putem), koji je najvažniji put širenja. Međutim, moguće je prenošenje infekcije i putem kontaminirane vode i hrane (1,7,16).

Svetska Zdravstvena Organizacija je 2015. godine svoju kampanju posvetila važnosti obezbeđivanja sigurne hrane širom sveta. Kampanja „Bezbedna hrana od farme do tanjira“, ima za cilj da ukaže da kontaminacija hrane može da se dogodi na svim nivoima u lancu ishrane, od produkcije i transporta, do pripreme i konzumiranja hrane. Ovo predstavlja značajan javnozdravstveni problem, za čije rešenje je potrebna udružena akcija stručnih, ali i vladinih i nevladinih organizacija. Poznavanjem uzroka gastroenterokolitisa, kao i puteva prenošenja uzročnika, moguće je sprovoditi mere prevencije i kontrole i onemogućiti dalje širenje infekcije (25). Tako, naprimer, velika otpornost rotavirusa u spoljašnjoj sredini uslovljava njihovu visoku kontagioznost. Kod obolelih osoba se izlučuju velike količine virusa, tako da se u jednom gramu stolice može naći i do 10^{11} virusnih čestica. Virus se izlučuje nekoliko dana pre početka simptoma i 8-10 dana posle infekcije, a kod imunokompromitovanih bolesnika izlučuje se virus i 2-3 nedelje. Trajanje izlučivanja ne mora biti u korelaciji sa težinom kliničke slike oboljenja (26).

Ispitivanja su pokazala da je poslednjih godina došlo ponovo do porasta broja gastroenterokolitisa virusne etiologije. Ova pojava je prisutna, kako u zemljama u razvoju, tako i u

vrlo razvijenim zemljama, gde postoje postupci kontrole namirnica i gde su bolji higijenski standardi. Zbog toga, virusni gastroenterokolitis predstavlja značajan javno zdravstveni problem širom sveta (7).

Porast broja virusnih gastroenterokolitisa nastaje iz sledećih razloga:

1. Pri virusnim kontaminacijama hrane i vode za piće potrebne su manje infektivne doze za pojavu bolesti (dovoljno je 10 do 100 virusnih čestica za nastanak infekcije).
2. Virusi se izlučuju putem ekskreta inficirane osobe (koja ima simptome, kao i one koja ih nema) i to u velikim količinama (preko 10^{11} čestica virusa izdvojeno je iz 1g stolice inficirane osobe).
3. Izlučivanje virusa počinje pre pojave simptoma (još u fazi inkubacije), a može da se nastavi i više nedelja posle prestanka bolesti, mada ređe.
4. Česte su inaparentne (asimptomatske) infekcije, kojima se virus nesmetano širi u populaciji.
5. Većina virusnih uzročnika su otporni u spoljnoj sredini (dobro podnose visoke i niske temperature, veće promene pH vrednosti, sušenje, dejstvo dezinfekcionih sredstava i drugih hemijskih supstanci, koje uništavaju ostale mikroorganizme).
6. Virusima je neophodna živa ćelija određenog domaćina da bi se mogli umnožavati, tako da se u hrani i vodi za piće neće umnožavati. Zbog toga, njihova prisutnost u hrani neće izazvati vidljive promene hrane (nema vidljivih promena mirisa, ukusa i izgleda hrane), a takve promene nastaju pri bakterijskoj kontaminaciji hrane.
7. Čuvanje hrane na nižim temperaturama (od 4°C do -20°C) pogoduje produženju infektivnosti virusa u ovoj hrani.
8. Hrana koja odgovara zahtevima bakterijskih standarda i provera, ne mora biti bez virusne kontaminacije. Dakle, kontaminacija hrane virusima je poseban javno zdravstveni problem, koji mora biti preveniran planiranjem posebnih mera provere i kontrole ispravnosti namirnica.
9. Tehnike, kojima se dokazuju virusi, mnogo su složenije od onih koje se primenjuju za identifikaciju drugih mikroorganizama (traže savremenu i skupu opremu i dobro poznavanje ovih dijagnostičkih tehnika, pri čemu je zlatni standard u dijagnostici virusa real-time *PCR* test).

Virusi najčešće kontaminiraju voće, povrće, kao i hranu koja se jede sveža, bez prethodne termičke obrade. Opasnost od kontaminacije postoji posebno kod voća, kao što su maline i kupine, jer se one ne mogu prati tako temeljno, kao čvrsti i otporni plodovi. Pošto se virusi umnožavaju samo u ćelijama određenog domaćina, zavisno od njihove selektivnosti, dele se na biljne, animalne (od koji neki mogu da inficiraju i ljude) i humane viruse. Zbog toga, infekcija čoveka, koji konzumira voće i povrće, obično nastaje prenosom virusa, uzročnika infekcija ljudi, putem kontaminacije biljaka preko vode, zemljišta, đubriva, opreme za berbu, ili preko zaraženih osoba, koje rukuju ovim proizvodima, posebno ako one ne praktikuju odgovarajuću ličnu higijenu. Ova

opasnost se naročito odnosi na voće koje se pre konzumiranja ili tokom prerade ne pere detaljno. Kada ovako kontaminirano voće stoji, ne menja mu se izgled, miris i ukus, jer virusi ne izazivaju propadanje hrane. Isto tako, relativno mali broj virusnih čestica (manje od 100) može da izazove bolest, pa i da dovede do epidemije. Virusni mogu mesecima da opstanu u hrani ili u zemljištu, u vodi ili na različitim površinama. Većina virusa je otpornija od bakterija na hlađenje, zamrzavanje, sušenje, ultravioletne zrake, toplotu i određena dezinfekciona sredstva, koja se koriste u prehrambenoj industriji. Zato je održavanje opšte i lične higijene često efikasnije od korišćenja sanitarnih sredstava (26-29).

Najčešći virusi, koji se mogu prenositi hranom i vodom, a izazivaju oboljenja ljudi su: norovirus, rotavirus, astrovirus i enterični adenovirusi (najčešće tipovi 40 i 41) (26,29).

Hepatitis A i E virus i enterovirusi mogu da izazovu digestivne tegobe, ali osnovnu bolest uzrokuju kada se prošire do organa prema kojima imaju tropizam. Redi izazivači gastroenterokolitisa, koji nastaje unošenjem kontaminirane hrane su: sapovirus, bocavirus, aichi virus. Isto tako, neki virusi koji su životinjski ili ptičiji, kada se unesu u organizam čoveka mogu da izazovu gastrointestinalne tegobe: ptičiji influenza A virus H₅N₁, SARS Coronavirus i Nipah virus. Poslednja tri navedena virusa su skoro opisani kao mogući uzročnici gastroenterokolitisa prenetog hranom i vodom, pa zbog toga još nema dovoljno podataka o tačnom načinu njihovog prenošenja, kao ni o mehanizmu izazivanja oboljenja ljudi (26,28).

2.0. Vrste virusnih uzročnika gastrointestinalnog sindroma

Na osnovu simptoma tokom infekcije, nabrojani virusi mogu biti grupisani na:

1. viruse, koji izazivaju tipične simptome gastroenterokolitisa (norovirus, rotavirus, astrovirus, enterični adenovirus, pa i mnogo ređe sapovirus, bocavirus i aichi virus),
2. viruse, koji izazivaju enterično prenet hepatitis, praćen digestivnim tegobama (hepatitis A i E),
3. viruse, koji se umnožavaju u gastrointestinalnom traktu čoveka, izazivajući digestivne tegobe, ali osnovnu bolest uzrokuju samo kada se prošire do drugih organa, prema kojima imaju tropizam (centralnog nervnog sistema u slučaju enterovirusa) i
4. virusi, koji povremeno mogu biti preneti hranom, iako to nije njihov uobičajeni put prenošenja, pri čemu mogu dovesti do digestivnih tegoba (ptičiji influenza virus H₅N₁, SARS Coronavirus, Nipah virus) (11).

Interesantno je da su skoro svi nabrojani virusi, koji se prenose hranom i vodom, mali virusi, koji poseduju pozitivan lanac jednolančane ribonukleinske kiseline (RNK) kao virusni genom. Oko virusnog jezgra imaju samo proteinski omotač (kapsid), a nemaju drugi omotač (peplos). Zato su otporni u spoljnoj sredini na dejstvo dezinficijensa i raznih organskih supstanci. Rotavirus, jedini od

RNK virusa ima dvolančani RNK genom sa 11 segmenata, što mu omogućava i veću promenljivost. Enterični adenovirusi imaju, međutim, dvolančani DNK genom, dok humani Bokavirus, koji spada u porodicu Parvoviride, ima jednolančanu DNK kao genom (30,31).

Kontaminacija hrane virusima najčešće može da nastane na tri načina:

1. direktnim kontaktom hrane sa ljudskim fecesom i drugim otpadom (hrana se kontaminira prilikom zalivanja, đubrenja i raznih agrohemijskih aplikacija) (27-29).
2. prenošenjem virusa preko ruku, predmeta i površina za rad, ukoliko su osobe koje rade sa hranom inficirane i ne vode računa o ličnoj higijeni (izlučuju viruse stolicom ili se virusi nalaze u povraćenom materijalu, pri čemu može da se stvori aerosol, a o ulozi kapljica iz aerosola ima različitih mišljenja – 29,32,33). Ova vrsta kontaminacije može da se dogodi na bilo kom nivou lanca ishrane – od ubiranja plodova, pakovanja, transporta, pa sve do pripreme hrane u restoranima ili kućama.
3. zoonotična infekcija – infekcija životinjskim virusima, unetim u organizam čoveka konzumiranjem mesa ili drugih proizvoda od životinja, koje su zaražene (28).

Obolele osobe izlučuju velike količine virusa u stolici. Virus se izlučuju najčešće jedan dan pre početka manifestne infekcije i 8-10 dana posle njenog prestanka. Kod imunokompromitovanih osoba mogu da se izlučuju i 2-3 nedelje (9,10,30).

Mnoge epidemiološke studije, sprovedene u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju, pokazuju da su rotavirusi, norovirusi, astrovirusi i adenovirusi (tipovi 40 i 41) glavni etiološki agensi dijarealnog sindroma (34-37).

Postoji atenuisana vakcina samo za rotaviruse. Vakcina se primenjuje kod osoba u riziku, posebno kod dece do 2 godine starosti. Prevencija vakcinom teških infekcija kod dece kreće se od 70 do 90%. Standardne metode prevencije akutnog virusnog gastrointestinalnog sindroma uključuju izolaciju obolelih i primenu ostalih higijensko-preventivnih mera.

2.1. Rotavirus

2.1.1. Morfologija i struktura rotavirusa

Spada u porodicu *Reoviridae*, rod *Rotavirus*. Rotavirus (RV) je prvi put otkriven i opisan kod ljudi 1973. godine u Australiji. *Bishop* i saradnici su virus zapazili pod elektronskim mikroskopom u bioptatu intestinalne sluznice dece obolele od akutnog nebakterijskog gastroenteritisa (38). Rotavirus je dobio ime zbog karakteristične građe, koja pod elektronskim mikroskopom liči na točak (latinski *rota* znači točak). Veličina virusne čestice je 60 do 80 nm. Ikozaedarne (kubične) je simetrije, a virusni genom čini dvolančana RNK, koja ima 11 segmenata.

Zato je virus vrlo varijabilan. Osim troslojnog proteinskog omotača (kapsida), virusna čestica nema drugi omotač (peplos), zbog čega je otporna u spoljnoj sredini (30, 39). Identifikovano je 8 različitih grupa rotavirusa (obeleženi A, B, C, D, E, F, G, H). Od njih 8, do nedavno se smatralo da samo 3 izazivaju bolest kod ljudi (A, B i C). Nedavno su i virusi grupe H, koja je skoro izdvojena, zabeleženi kao uzročnici dijareje kod ljudi (i prasadi) (39).

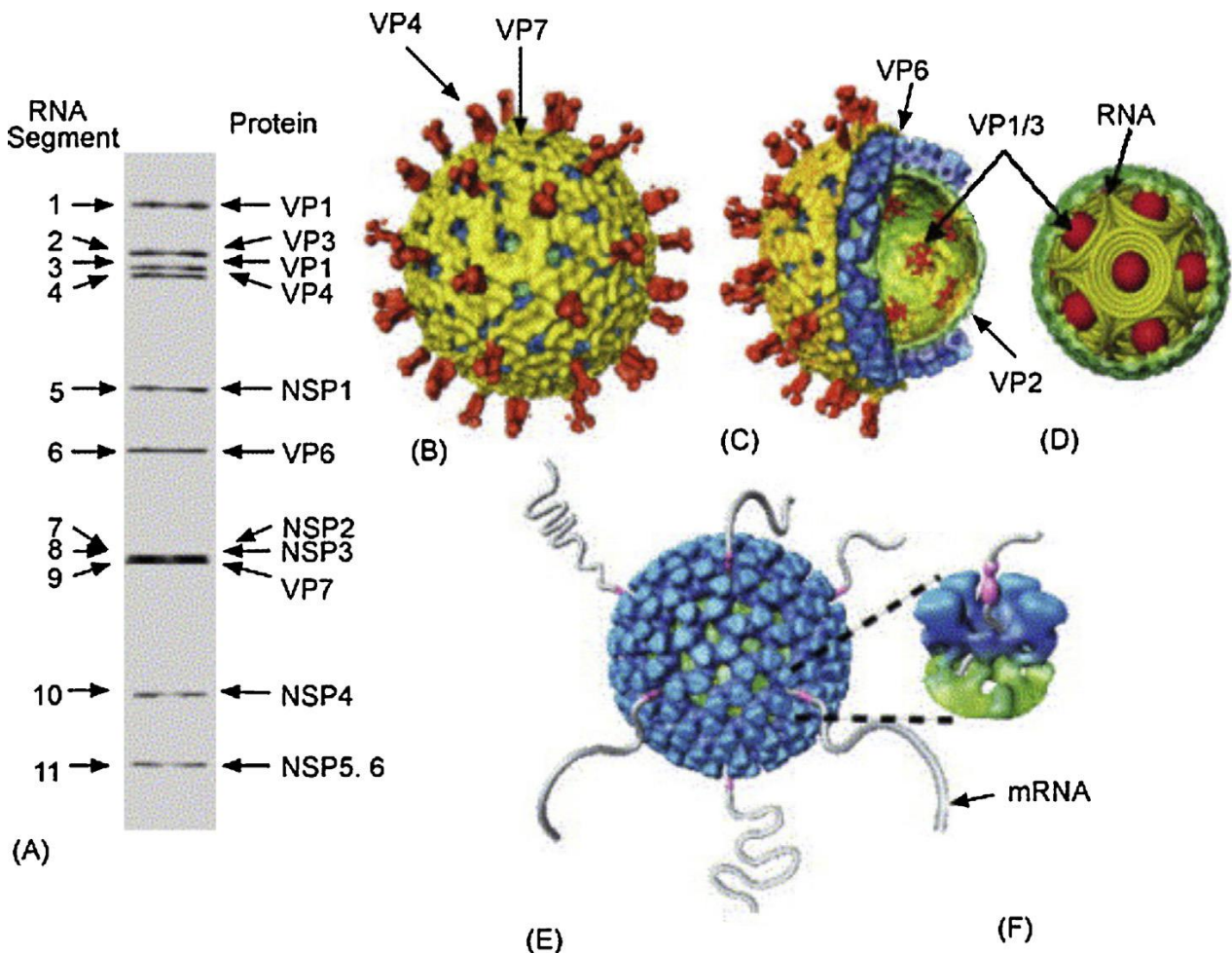
Najčešći uzročnik oboljenja kod ljudi širom sveta je grupa A rotavirusa (RVA). Više od 90% rotavirusnih infekcija u svetu je izazvano virusima iz grupe A (39). Oni se izlučuju u stolici inficiranih u velikoj količini (10^{12} u gramu stolice i to pre pojave simptoma i nekoliko dana pošto simptomi prestanu) (26).

Grupa B rotavirusa izaziva uglavnom dijareju kod odraslih, pa se i naziva „rotavirusom dijareje odraslih“. Prvi slučajevi su zabeleženi u Kini, gde su nastale velike epidemije teških dijareja (40,41). Kasnije su zabeleženi slučajevi gastroenteritisa odraslih i dece i u Indiji, Nepal u i Bangladešu (42-44)

Grupa C rotavirusa izaziva dijareje kod dece, koja su nešto starija (obično 4 do 7 godina), ali i kod odraslih. Grupa C rotavirusa je opisana kao uzročnik infekcija u Aziji, Australiji, Evropi, Centralnoj i Južnoj Americi (45-48). Uglavnom se povezuje sa sporadičnim slučajevima gastroenteritisa, ali su opisane i epidemije uzrokovane virusima iz ove grupe (49,50).

Tri tipa rotavirusnih čestica mogu se prepoznati pod elektronskim mikroskopom: 1. Kompletna infektivna čestica ili troslojna čestica (TLP), 2. Dvoslojna čestica (DLP) i 3. Jezgro ili jednoslojna čestica (39). Virusni genom, dvolančana RNK, sastavljen od 11 segmenata, ukoliko je deproteinizovan (izolovana samo RNK) nije infektivan. To ukazuje na činjenicu da rotavirusi imaju sopstvenu RNK-zavisnu RNK polimerazu (VP1), koja prepisuje pojedinačne RNK segmente u aktivnu informacionu RNK (iRNK) (52). Virusni genom kodira sintezu 6 strukturnih proteina (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 i VP7), koji grade virion, kao i 6 nestrukturnih proteina (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6). Nestrukturni proteini imaju ulogu u različitim virusnim procesima, uključujući transport iRNK do mesta replikacije, kao i ulogu u samoj replikaciji genoma, sastavljanju virusne čestice i stimulaciji ekspresije virusnih gena. Svaki od 11 genskih segmenata kodira sintezu po jednog proteina, osim segmenta 11, koji kodira sintezu dva različita nestrukturna proteina (NSP5 i NSP6) (39). Unutrašnji proteinski sloj viriona je formiran od proteina jezgra VP2 (53). Vezani sa unutrašnjom stranom VP2 sloja su dva proteina: virusna RNA-zavisna RNA polimeraza (VP1) i enzim VP3, koji katalizuje procese, koji omogućavaju stabilizaciju i sazrevanje iRNK sposobne za sintezu proteina (engl. „*mRNA capping*“) (54,55). Zajedno, VP1, VP2, VP3 i dvolančana RNK (genom) formiraju virionsko jezgro. Jezgro je okruženo proteinom VP6, koji čini jedinu komponentu središnjeg proteinskog sloja (dvoslojna rotavirusna čestica - DLP). Spoljašnji

proteinski sloj viriona sastoji se uglavnom od VP7 glikoproteina. Iz spoljašnjeg sloja štrče šiljci, napravljeni od proteina VP4. Cepanje VP4 šijka od strane tripsinu-sličnih proteaza, otkriva konformacijskim promenama dva polipeptida, VP8* i VP5*, koji imaju ulogu u adherenciji za ćeliju domaćina (56). U zaraženom domaćinu, intestinalne proteaze, koje su slične tripsinu, rasturaju VP4, stimulišu interakciju virusa sa ćelijom i naknadno prodiranje virusa u osetljive intestinalne enterocite.



Slika 1. Struktura rotavirusa (A) Prikaz 11 segmenata dvolančane RNK na poliakrilamid gelu (B) Struktura rotavirusne troslojne čestice (TLP) (C) Presečena TLP čestica sa prikazom unutrašnjih slojeva (D) Šematski prikaz organizacije genoma, gde su segmenti genoma predstavljeni kao invertovane konične spirale oko transkripcionih enzima unutar VP2 sloja (zeleno) (E i F) Model dvoslojne rotavirusne čestice (DLP) tokom transkripcije (adaptirano prema referenci 51)

NSP4 je, nakon ispitivanja i njegovog dokazivanja u uzorcima tečnih stolica eksperimentalno inficiranih životinja sa dijarejom i njegovog odsustva u stolicama eksperimentalnih životinja bez dijareje, označen kao specifičan enterotoksin, po prvi put dokazan kod virusa. Tako je potvrđena njegova uloga u razvoju dijareje kod osoba inficiranih rotavirusom. NSP4, kao prvi virusni enterotoksin, oslobađa se na bazalnom polu inficiranih ćelija, dovodeći do razvoja dijareje

kod inficirane osobe, mada su promene na enterocitima skoro morfološki nevidljive. Međutim, u patogenezi rotavirusnih infekcija potvrđeno je i da crevne resice enterocita imaju poremećaj u lučenju enzima koji razgrađuju saharozu, laktozu i druge disaharide, kao i oligosaharide iz hrane, što dovodi do pojave tečnih stolica. Uz gubitak disaharida i smanjenje apsorpcije glukoze i D-ksiloze, iz organizma se gube bikarbonati i voda, što dovodi do dehidratacije. Dolazi i do poremećaja ravnoteže elektrolita (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), a NSP4 deluje na ćelije digestivnog trakta i tako što povećava sekreciju Cl^- (52,57).

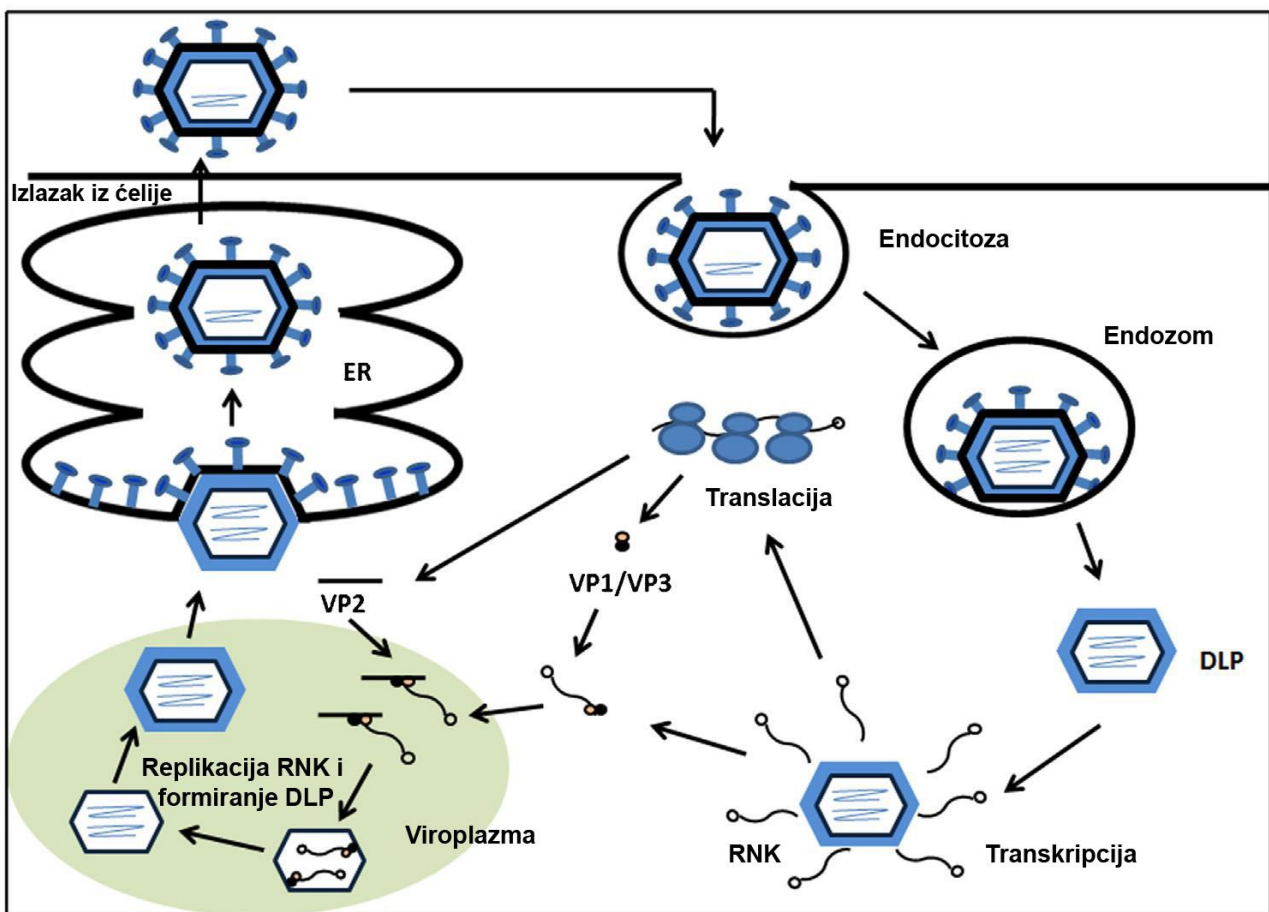
Tabela 2. Strukturni i nestrukturni proteini rotavirusa

RNK segment (gen koji kodira sintezu)	Protein	Lokacija	Funkcija
1	VP1	Jezgro	RNK zavisna RNK polimeraza (RdRp), vezuje jednolančanu RNK, formira kompleks sa VP3
2	VP2	Jezgro	Stimuliše replikaciju virusne RNK, neophodna za aktivnost RdRp
3	VP3	Jezgro	Guanililtransferaza, vezuje jednolančanu RNK, formira kompleks sa VP1
4	VP4	Spoljašnji sloj kapsida	Vezivanje za ćeliju, P tip neutralizacionog Ag, virulencija
5	NSP1	Nestrukturni	Vezuje 5' kraj virusne RNK
6	VP6	Srednji sloj kapsida	Antigen specifičan za vrstu, neophodan za transkripciju
7	NSP3	Nestrukturni	Pojačava aktivnost virusne iRNK, inhibira celularnu sintezu proteina
8	NSP2	Nestrukturni	NTPaza, esencijalan za formiranje viroplazme, vezuje RNK
9	VP7	Spoljašnji sloj kapsida	G tip neutralizacionog Ag, glikoprotein
10	NSP4	Većinom nestrukturni	Enterotoksin, virulencija, moduliše intraćelijsku količinu Ca^{2+} i RNK replikaciju, intraćelijski receptor za DLP tokom replikacije
11	NSP5	Nestrukturni	Vezuje RNK, esencijalan za formiranje viroplazme, interakcija sa VP2
11	NSP6	Nestrukturni	Lokalizovan u viroplazmi, interakcija sa NSP5

2.1.2. Replikacija rotavirusa

Rotavirusni replikacioni ciklus obuvata:

- 1) vezivanje virusa za ćeliju domaćina, posredovano VP4 i VP7 proteinima,
- 2) penetraciju i dekapidaciju,
- 3) sintezu pozitivnog lanca jednolančane RNK (iRNK), posredovano VP1, VP3 i VP2,
- 4) formiranje viroplazme, pakovanje i replikaciju dvolančane RNK, kao i formiranje dvoslojnih čestica (DLP),
- 5) sazrevanje virusne čestice (stvaranje troslojne čestice - TLP) i oslobađanje iz ćelije domaćina (52).



Slika 2. Šema rotavirusnog replikacionog ciklusa (adaptirano prema referenci 58)

Efikasna replikacija zahteva cepanje VP4 proteinskog šiljka spoljašnjeg kapsida, što omogućava da dođe do konformacijske promene (pojave VP8* i VP5*) da bi virus mogao da reaguje sa ćelijskim receptorima. Virus ulazi u ćeliju receptorski-posredovanom endocitozom i formira vezikulu - endozom. Proteini spoljašnjeg sloja kapsida (VP7 i VP4) dovode do poremećaja u membrani endozoma, što izaziva promenu u koncentraciji kalcijuma. Uklanjanje spoljašnjeg kapsidnog VP7 sloja, izazvano niskim količinama kalcijuma u endozomu, rezultira oslobađanjem

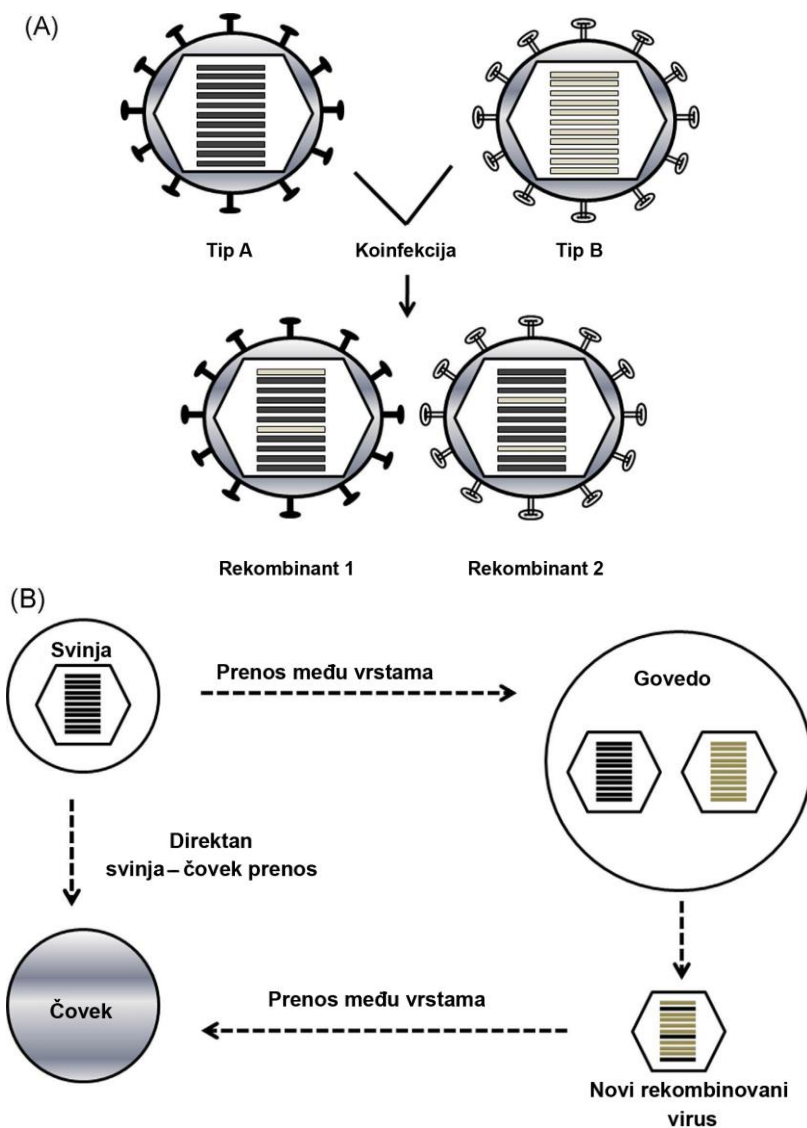
transkripciono aktivnih dvoslojnih čestica (DLP) u citoplazmu. Dolazi do stvaranja virusne informacione RNK (iRNK), koja služi za translaciju proteina i kao šablon za replikaciju RNK genoma. U specijalizovanim strukturama nazvanim viroplazma, kojima su potrebne komponente lipidnih kapljica za formiranje, dolazi do akumulacije stvorenih proteina i replikacije genoma. Viroplazma se formira oko ćelijskog jedra već dva sata nakon virusne infekcije, a sastoji se od tzv. „virusnih fabrika”, koje se smatra da su napravljene od dva virusna nestrukturna proteina: NSP5 i NSP2. U viropazmi se odvija pakovanje genoma u novoformirane dvoslojne čestice (DLP). Sklapanje troslojnih čestica (TLP) se odvija u endoplazmatskom retikulumu. Novoformirane DLP se vezuju za NSP4, koji služi kao intracelularni receptor endoplazmatskog retikuluma i ulaze u endoplazmatski retikulum, gde dolazi do pupljenja čestica. Tokom ovog procesa, zapažaju se tranzijentne (privremene) čestice sa omotačem. Formiranjem proteina VP4 i VP7 spoljašnjeg kapsida, privremeni omotač se gubi i dolazi do sazrevanja u troslojne čestice (TLP). Novostvoreni virioni se oslobađaju kroz lizu ćelije. U polarizovanim epitelnim ćelijama, čestice se oslobađaju neklasičnim mehanizmom vezikularnog transporta (39,52,58). Sve ovo je prikazano na slici 2.

2.1.3. Klasifikacija i raznovrsnost rotavirusa

Razlike u antigenskim karakteristikama i genskim sekvencama omogućavaju dalju klasifikaciju unutar roda na serogrupe (grupe), podgrupe, serotipove i genotipove. Protein srednjeg sloja kapsida (VP6) odgovoran je za grupnu i subgrupnu specifičnost virusa. Kao što je rečeno, postoji 8 grupa u rodu *Rotavirus* (A-H) (39). U okviru grupe A rotavirusa mogu se razlikovati 4 podgrupe (SGI, SGII, SGI+II, SG nonI-nonII). Podela je prema reaktivnosti na monoklonalna antitela, specifična za dve podgrupe (59-62). Serotipovi i genotipovi grupe A rotavirusa se određuju na osnovu specifičnosti dva proteina spoljašnjeg sloja kapsida (VP7 i VP4). Ova dva virusna proteina, kao antigeni, izazivaju produkciju specifičnih neutrališućih antitela u organizmu domaćina. VP7 antigen određuje G (glikoprotein) serotipove i genotipove, dok VP4 antigen određuje P (proteaza-osetljive) serotipove i genotipove. Upotreba termina serotip i genotip zavisi od korišćene dijagnostičke metode (serološke reakcije sa monoklonalnim antitelima za serotipove, ili molekularne tehnike za genotipove) (39). Prema dosadašnjim podacima, rotavirusi grupe A ljudi i životinja su podeljeni u 27 G i 37 P genotipova na osnovu razlika u njihovim VP7 i VP4 genskim sekvencama (39,63,64). Kod inficiranih ljudi do sada su potvrđeni 12 G i 15 P genotipova (39,64).

Geni koji kodiraju VP7 i VP4 proteine se nezavisno odvajaju i dovode do velikog broja G-P kombinacija. Razne studije pokazuju postojanje više od 70 različitih G-P kombinacija. Međutim, širom sveta oko 74% rotavirusnih infekcija, praćenih dijarejom, imaju genotipske kombinacije

G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] ili G9P[8] (58,65,66). Pored uobičajenih tipova, veliki broj epidemioloških istraživanja ukazali su na postojanje i mnogih retkih i neuobičajenih tipova kod ljudi. Smatra se da je evolucija rotavirusa rezultat četiri mehanizma: 1) tačkaste mutacije (akumulacijom nastaju genetski driftovi – najčešće su promene u neutralizujućim antigenima), 2) rekombinacija gena tokom koinfekcije dva različita humana virusa u zajedničkom domaćinu (antigenski šift – češći među članovima iste genogrupe, ali je moguća razmena gena i među članovima različitih genogrupa), 3) prenošenje celog životinjskog virusa ili njegovog genskog segmenta na ljude (zabeleženi su slučajevi infekcija kod ljudi, koji su bili u bliskom kontaktu sa životinjama, izazvani neuobičajenim goveđim ili svinjskim tipovima ili tokom koinfekcije u čoveku rekombinacija humanih i životinjskih tipova) i 4) rearanžiranje gena u genomu, koji pre svega kodiraju nestrukturane proteine (delecija, duplikacija, insercija). Svi ovi mehanizmi mogu da se odvijaju pojedinačno ili u kombinaciji jedni sa drugima, što dovodi do velike raznovrsnosti rotavirusa (1,58).



Slika 3. Mehanizmi evolucije rotavirusa (adaptirano prema referenci 58)

2.1.4. Otpornost rotavirusa

Rotavirus je veoma otporan u spoljnoj sredini i ne uništava ga postupak dezinfekcije, koji se koristi za uništavanje bakterija. Stabilan je na različitim vrednostima pH (od 3 do 11). Dakle, otporan je i u kiseloj i u alkalnoj sredini. Virus može da opstane čak 32 dana na niskim temperaturama (od 4⁰C do -20⁰C). Može da izdrži 6 ciklusa naizmeničnog smrzavanja i otapanja. Stabilan je do 4 dana na 37⁰C van žive ćelije, ali se brzo inaktivise na 56⁰C (26).

2.1.5. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike rotavirusne infekcije

Rotavirus najčešće izaziva infekcije kod odojčadi i male dece. Procenjuje se da broj smrtnih slučajeva u svetu iznosi 500 hiljada godišnje. Posle uvođenja vakcine protiv rotavirusa 2006. godine, opao je broj obolelih i smrtnih slučajeva u SAD-u (67).

Infektivne doze virusa su niske (10 do 100 virusnih partikula), a viruse izlučuju osobe koje imaju i simptomatski i asimptomatski oblik bolesti. Inkubacija traje od 24h do 72h. Posle inkubacije, dominantan simptom su vodenaste stolice, praćene povraćanjem, bolovima u stomaku i povišenom temperaturom. Ako je bolest težeg oblika, može doći do dehidracije, hipovolemijskog šoka, pa i smrti, ukoliko se ne nadoknadi izgubljena tečnost i elektroliti (39,64). Bolest obično traje 3 do 7 dana, ali kod težih oblika bolesti može da traje do 14 dana. Otprilike 5 dana pre simptoma bolesti virus počinje da se izlučuje u stolici u velikoj količini (10¹² u g stolice) i to traje nekoliko dana pošto simptomi prestanu. Obično najveća količina virusa se izlučuje trećeg dana bolesti, a posle sedmog dana počinje da se smanjuje količina virusa. Međutim, opisani su slučajevi kod odojčadi i male dece mlađe od 5 godina da se virus izlučivao u stolici i nekoliko nedelja posle bolesti. Obično, što je bio teži oblik bolesti, to će i duže trajati izlučivanje virusa u stolici (64,68). Nedavna istraživanja su pokazala da se rotavirusne infekcije mogu širiti izvan creva, što dovodi do nastanka antigenemije i viremije (69,70). Klinički značaj rotavirusnog ekstraintestinalnog širenja nije sasvim jasan, iako postoji veći broj izveštaja, koji ukazuju na njegovu povezanost sa bolestima drugih simptomatologija. Najzastupljeniji su izveštaji o rotavirusnoj infekciji, koja utiče na centralni nervni sistem, što može da dovede do nastanka konvulzija, aseptičnog meningitisa i encefalitisa (71,72).

Virus može biti unet preko kontaminiranih ruku, pribora, posuđa ili kontaminirane hrane i vode. Prenosi se najčešće direktno fekalno-oralnim putem. Inficirani radnici, koji rade sa hranom, mogu kontaminirati hranu (64). Hrana kojom se obično prenosi virus je ona koja ne zahteva termičku obradu (salate, voće, predjela). Infekcije mogu da nastanu i u dečijim kolektivima. U

područjima sa umerenom klimom obično su češće infekcije u jesen i zimu, a u tropskim predelima javljaju se cele godine (64,73-75). Sezonsko javljanje u zemljama sa umerenom klimom verovatno proizilazi iz nepovoljnih uslova za prenos rotavirusa u letnjim mesecima, kao što su više temperature (otežavaju preživljavanje virusa u životnoj sredini), visoka relativna vlažnost i ređa pojava brzog širenja u porodicama i zajednicama (75).

Najosetljivija na bolest su deca od 3 meseca do 3 godine, kao i prevremeno rođena deca. Bolest može da se javlja i kod starijih osoba. Tada su najteži simptomi kod obolelih sa hroničnim bolestima i kod imunodeficitarnih osoba (67,76).

Prva infekcija rotavirusom, naročito ako se javi posle tri meseca života, po pravilu je najteža. Mogućnost ponovne infekcije istim serotipom objašnjava se kratkotrajnim prisustvom sekretornih IgA antitela (često je to manje od godinu dana). Ukoliko se infekcija ponovi, najčešće protiče sa blažom simptomatologijom. To se pripisuje ulozi memorijskih T-limfocita. Smatra se da ovo donekle pomaže nastanku imuniteta (33,67).

Za povoljan tok i ishod bolesti bitno je da se što pre postavi dijagnoza, kao i da se primene terapijske mere. To je nadoknada tečnosti, davanje cinka, ali i nastavak dojenja, tj. hranjenja obolelog deteta. Teoretski je moguća i pasivna – veštačka imunizacija, pri čemu se oralno daju specifična antitela. Ova metoda se ipak ne primenjuje rutinski, mada ima navoda da skraćuje trajanje bolesti (33).

2.1.6. Vakcinacija protiv rotavirusa

SZO navodi da primenjene opšte mere zaštite protiv infekcije rotavirusom nemaju uvek efikasano delovanje, pa se ističe da je za primarnu prevenciju značajna vakcinacija. Preporučuje se da vakcina protiv rotavirusa bude uključena u program imunizacije, posebno u nerazvijenim zemljama. U našoj zemlji ova vakcina ne spada u obavezne, a ni u preporučene vakcine. Naime, od rotavirusne infekcije, koja nije naročito česta kod nas, nema umiranja obolelih, a cena vakcine je vrlo visoka (33).

U široj upotrebi u svetu su dve vrste vakcina protiv rotavirusa. Za pravljenje obe koriste se Vero kulture ćelija. RV5 (RotaTeq) je rekombinantna vakcina, sastavljena od pet humanih i bovinih sojeva rotavirusa. Bovini sojevi imaju ulogu da vrše ekspresiju humanih serotipova. Vakcina se isporučuje u obliku suspenzije u puferskom rastvoru od 2ml, a daje se u tri doze. Druga vakcina RV1 (Rotarix) sadrži atenuisani soj rotavirusa humanog porekla. Sastoji se od liofilizovanog praha (1ml), ili od već pripremljenog rastvora (1,5ml). Daje se u dve doze. Vakcine se ne čuvaju u zamrzivaču, nego u običnom frižideru. Daju se odmah po vađenju iz frižidera (vakcina RV5), ili u

roku od 24 sata od rastvaranja (vakcina RV1). Obe vakcine se daju oralno. Primenjuju se dve ili tri doze, zavisno od uputstva i to počev od navršenog drugog meseca života. U područjima gde je visok rizik, vakcina se može dati i posle šeste nedelje od rođenja. Razmak između doza je 1-2 meseca, što nije striktno zacrtano, ali sve mora da bude uklopljeno u naznačene vremenske granice. Gornja granica za prvu dozu je oko 14 nedelja do 32 nedelje, ili 8 meseci do 24 meseca. Podatak o gastrointestinalnim tegobama nije razlog da se ne započne ili da se ne dovrši vakcinacija. Efekti vakcinacije, imunitet posle date vakcine (obično traje jednu do dve sezone), kao i moguća neželjena dejstva (koja nisu velika), sve su to faktori koji se još uvek upoređuju sa krajnjim efektom vakcinacije. Vakcina se ipak preporučuje, posebno u zemljama sa visokom učestalošću gastrointestinalnog sindroma kod novorođenčadi i male dece (33,67).

Vakcina, koja nije više u upotrebi, bila je povezana sa intestinalnom invaginacijom kao komplikacijom, dok je kod danas korišćenih vakcina taj rizik sveden na minimum, a efekti vakcinacije se ističu kao pozitivni (33). Za ostale virusne uzročnike gastrointestinalnog sindroma vakcine za sada još nisu napravljene.

Dijagnoza rotavirusne infekcije može da se postavlja na osnovu imunoenzimskog testa (ELISA - engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) i testa latex-aglutinacije za dokazivanje virusnih antigena, ali mnogo osetljivije dijagnostičke metode, za utvrđivanje prisustva virusa u uzorku, su elektronska i imunoelektronska mikroskopija kao i *RT-PCR* test (reverzna transkripcija *PCR* test). Rotavirus se u uzorcima hrane i vode dokazuje *RT-PCR* testom, zbog preciznosti i brzog izvođenja ovog testa (77,78). Moguće je i kultivisanje rotavirusa u nekim primarnim kulturama ćelija, kao i u kontinuiranim linijama ćelijskih kultura (ćelijama bubrega afričkog zelenog majmuna i kontinuiranim linijama ćelija bubrega Rhesus majmuna – MA104). Međutim, ovaj postupak se ne koristi u rutinskom radu za dijagnostiku rotavirusa, pošto je postupak umnožavanja na kulturi ćelija dugotrajan, složen i česta je pojava kontaminacije (64,77).

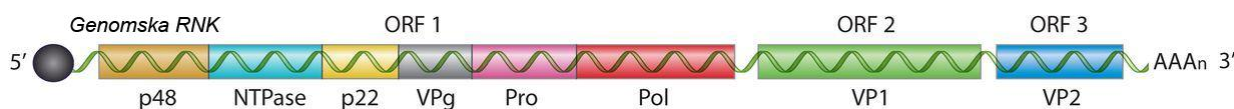
2.2. Norovirus

2.2.1. Morfologija i struktura norovirusa

Spada u porodicu *Caliciviridae*, rod *Norovirus* (ranije nazvan *Norwalk-like virus*). Pored roda *Norovirus*, u porodici *Caliciviridae* postoji još četiri roda: *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus* i *Vesivirus*. Pored roda *Norovirus*, i virusi iz roda *Sapovirus* (*Saporo-like virus*), mogu da izazivaju slična oboljenja kod ljudi, ali znatno ređe (79,80).

Humani norovirus, ranije nazvan *Norwalk-like virus*, je prvi put identifikovan u uzorcima stolice prikupljenim tokom epidemije gastroenteritisa u osnovnoj školi u gradu *Norwalk* u Ohaju 1968. godine (81). Bolest izazvana ovim virusom opisana je još 1929. godine kao „zimsko bolest povraćanja“ zbog sezonskog javljanja i pojave povraćanja kao dominantnog simptoma kod većine obolelih, mada virus tada još nije bio identifikovan (82).

Norovirus (NoV) predstavlja malu virusnu česticu (veličine 35-40 nm) sa ikozaedarnom (kubičnom) simetrijom. Virus nema drugi omotač osim kapsida, zbog čega je otporan u spoljnoj sredini (30). Pod elektronskim mikroskopom ovaj mali okrugli virus liči na čašicu sa 32 udubljenja na površini, po čemu je i dobio ime (calyx na grčkom znači čaša). Genom čini pozitivan lanac jednolančane RNK, veličine oko 7.6 kilobaza (kb). Kraj 5' genomske RNK je kovalentno vezan za virusno-kodirani protein, poznat kao VPg, dok je 3' kraj poliadenilovan. Genom se sastoji iz tri otvorena okvira za čitanje (ORF- engl. *Open reading frame*), sa izuzetkom mišijeg norovirusa, koji ima četvrti alternativni ORF. ORF1, ORF2 i ORF3 kodiraju sintezu 8 virusnih proteina. ORF1 kodira sintezu velikog poliproteina, koji se tokom translacije i nakon njenog završetka cepa dejstvom proteaze (NS6) na šest zrelih nestrukturnih proteina, uključujući i NS6. Ostali nestrukturani proteini, koji nastaju su: p48 (NS1/2), p41 (nukleozid trifosfataza-NS3), p22 (NS4), VPg (NS5) i RNK zavisna RNK polimeraza (NS7 - RdRp - engl. *RNA-dependent RNA polymerase*). ORF2 i ORF3 iz subgenomske RNK, stvorene tokom virusne replikacije, kodiraju kapsidne proteine. ORF2 kodira glavni protein kapsida VP1, dok ORF3 kodira mali strukturni protein kapsida VP2. Subgenomska RNA je identična sa poslednjih 2.4 kilobaza genoma i takođe na njenom 5' kraju kovalentno je vezan VPg, dok je 3' kraj poliadenilovan (79,80,83).

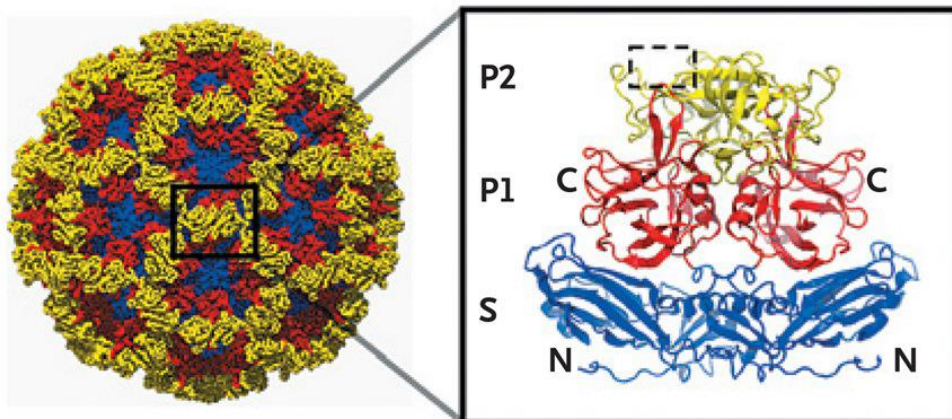


Slika 4. Organizacija genoma humanog norovirusa (adaptirano prema referenci 80)

Devedeset dimera VP1 proteina raspoređeni su tako da formiraju ikozaedarni virion (slika 5). Ovaj kapsidni protein ima nekoliko domena, uključujući domen N okrenut prema unutrašnjosti kapsida, zatim S domen, koji učestvuje u formiranju ikozaedarne ljuske, kao i P domen, koji formira izbočine na površini viriona. P domen se sastoji iz dva subdomena P1 i P2. Za hipervarijabilni region P2 domena se smatra da ima važnu ulogu u vezivanju za receptore ćelije, kao i u imunološkoj reaktivnosti. Verovatno je odgovoran za interakciju sa antigenima tkivno/krvnogrupnog sistema ABO, koji utiču na osetljivost osobe na norovirusne infekcije. VP2 protein je mali strukturni protein, prisutan u jednoj ili dve kopije po virionu. Pokazuje veliku

varijabilnost sekvenci kod različitih sojeva. Smatra se da je njegova uloga tokom replikacije u pakovanju genoma (84).

180 molekula (90 dimera) VP1



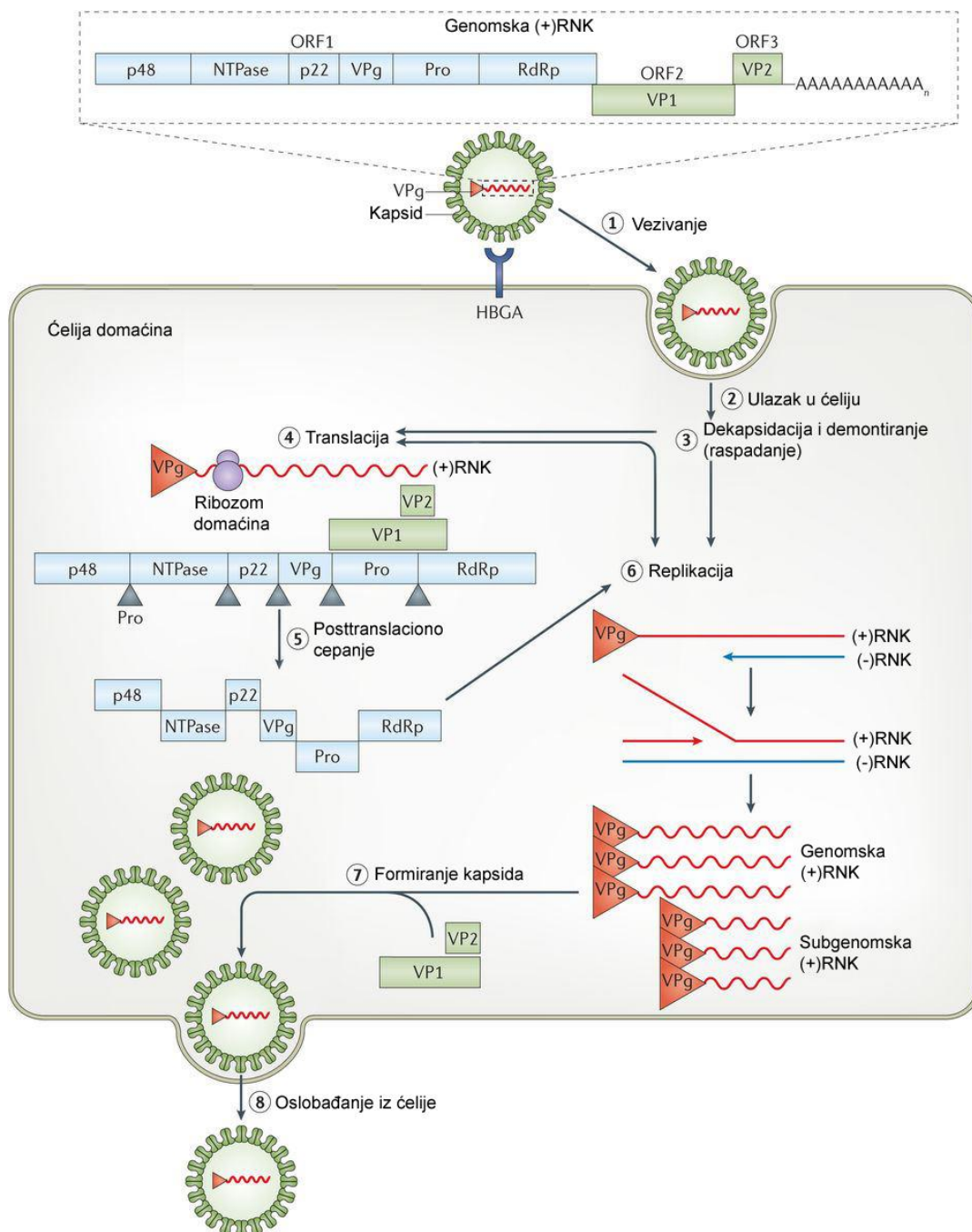
Slika 5. Struktura kapsida norovirusa (adaptirano prema referenci 85)

Jedna od najvažnijih prepreka u proučavanju norovirusa je nemogućnost njegove kultivacije u kulturi ćelija i nedostatak malog životinjskog modela, sličnog čoveku po osobinama i reagovanju, na kome bi se mogao ispitivati humani norovirus. Čestice slične virusima (VLP) kod norovirusa su se pojavile kao surogat sistem za indirektno proučavanje mnogih aspekata norovirusne biologije. VLP čestice se sastoje od više kopija norovirusnog kapsidnog proteina (VP1), koje se sastavljaju u prazne kapside. Ove čestice strukturno i antigenski oponašaju virus, osim što ne sadrže RNK, pa zato nisu infektivne (84). S obzirom na to da se humani norovirusi ne mogu umnožavati u kulturi ćelija, postoje brojni izazovi za moguće načine pravljenja vakcine, koja bi sprečila nastanak bolesti. Dobijanje norovirusnih čestica sličnih virusu (VLP) omogućilo je značajan napredak u mogućnosti budućeg dobijanja vakcine (86).

2.2.2. Replikacija norovirusa

Norovirusni replikacioni ciklus započinje vezivanjem virusa za ćeliju, njegovim ulaskom u ćeliju i dekapidacijom (oslobađanjem od omotača). Sve to se odvija preko direktne interakcije virusnih antigena na VP1 sa ćelijskim receptorima - ugljenim hidratima, glikolipidima i proteinima na površini ciljnih ćelija (antigenima tkivno/krvnogrupnog sistema domaćina). Nakon ulaska virusa u ćeliju, u citoplazmi ćelije pozitivni lanac jednolančane virusne RNK se ponaša kao iRNK. Dolazi do interakcije između VPg na 5' kraju virusnog genoma sa ćelijskim faktorima, koji započinju translaciju i aktivacije ribozoma. ORF1 deo genoma kodira sintezu poliproteina, koji se tokom translacije i nakon njenog završetka cepa dejstvom proteaze (NS6) na šest zrelih nestrukturnih proteina (p48, p41, p22, VPg, proteazu i RNK zavisnu RNK polimerazu). Novosintetisani virusni

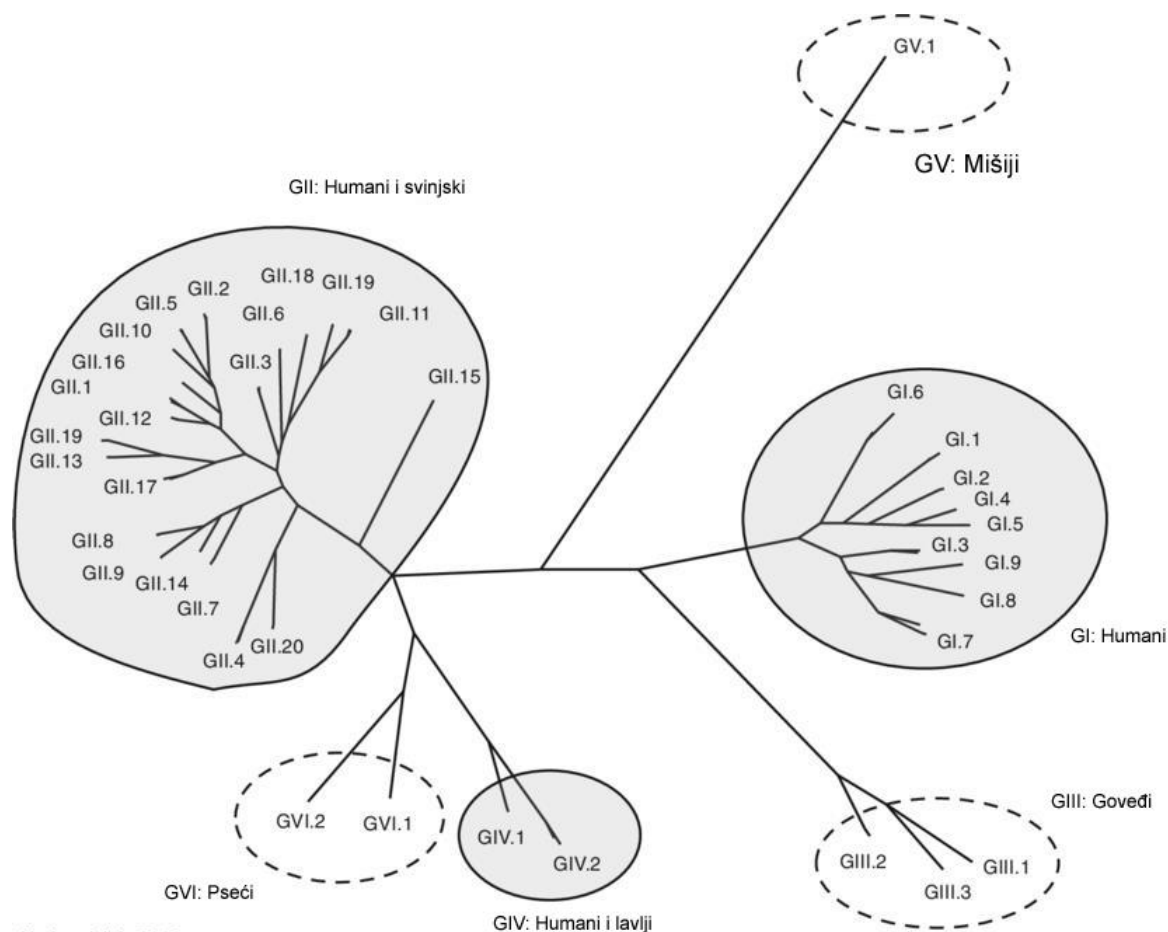
proteini stvaraju replikacioni kompleks, u kome se odvija umnožavanje RNK. Replikacija gena se odvija preko intermedijera - negativnog lanca RNK, koji služi kao šablon za sintezu nove genomske i subgenomske RNK, dejstvom virusne RNK zavisne RNK polimeraze (RdRp). Subgenomska RNK, koja sadrži samo ORF2 i ORF3, koristi se za produkciju kapsidnih proteina VP1 i VP2. Umnoženi genomi se dalje koriste za translaciju (unutar replikacionog kompleksa,) ili se pakuju u kapsid (VP1), stvarajući nove virione. Stvoreni virioni, zatim napuštaju ćeliju, a sam mehanizam izlaska iz ćelije za sada nije sasvim objašnjen (slika 6) (83,87).



Slika 6. Šematski prikaz životnog ciklusa norovirusa (adaptirano prema referenci 87)

2.2.3. Klasifikacija i raznovrsnost norovirusa

Na osnovu razlike u sekvenci aminokiselina kapsidnog proteina VP1, mogu se izdvojiti 6 genogrupa norovirusa (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI) i više od 40 genotipova (80). Najvažnije za ljude su GI (9 genotipova), GII (18 od 21 genotipa) i GIV (1 od 2 genotipa), koji mogu da inficiraju ljude. Genogrupa III može inficirati goveda, genogrupa V glodare, a genogrupa VI pse (slika 7) (88).



Slika 7. Genetska klasifikacija norovirusa (adaptirano prema referenci 88)

Velika raznovrsnost genotipova pripisuje se podjednako akumulaciji tačkastih mutacija, nastalih usled grešaka tokom RNK replikacije, kao i pojavi rekombinacije između dva srodna virusa. Uprkos ovoj raznolikosti, poslednjih godina samo je mali broj tipova bio uzročnik epidemija. (85). Najdominantniji norovirusni genotip, koji je većinom bio uzročnik epidemija je genotip 4 iz genogrupe II (GII.4). Ispitivanja pokazuju da je ovaj genotip bio uzročnik kod oko 60-90% prijavljenih slučajeva norovirusnog gastroenteritisa. Istraživanja koja su se bavila nadzorom nad norovirusom u različitim zemjama, pokazala su da kod GII.4 genotipa često dolazi do pojave novih antigentskih varijanti, što ukazuje da imunološki pritisak populacije utiče na evoluciju norovirusa. Važno je naglasiti da se pojava i širenje novih varijanti ovog specifičnog genotipa

poklapala sa povećanjem broja prijavljenih norovirusnih epidemija. Od 1995. godine, šest antigenski različitih varijanti GII.4 je dovelo do pojava pandemija: SAD 1995/96, Farmington Hills 2002, Hunter 2004, Den Haag 2006b, Nju Orleans 2009 i Sidnej 2012. Razlog zašto baš varijante GII.4 izazivaju velike epidemije, pa i pandemije nije u potpunosti jasan, ali istraživanja sugeriraju da bi to moglo biti zbog jedne ili kombinacije više sledećih razloga: zbog veće biološke adaptivnosti, zbog mogućnosti vezivanja za veliki broj različitih ćelijskih receptora, zbog brze replikacije i pojave učestalih mutacija, kao i zbog toga što izazivaju izlučivanje veće količine virusa kod zaraženih pacijenata (85,87,89).

U periodu 2014/2015. godine novi genotip norovirusa GII.17 se pojavio kao glavni uzročnik epidemija gastroenteritisa u Kini i Japanu. Poznato je da norovirusi GII.17 genotipa cirkulišu među ljudima oko 37 godina i sporadično su detektovani kao uzročnici u Africi, Aziji, Evropi, Severnoj i Južnoj Americi. U zimu 2014. godine genetski slični GII.17 virusi u potpunosti su zamenili prethodno dominantan GII.4 u pojedinim delovima Azije. Od tada GII.17 genotip je počeo da se učestalije javlja i u drugim delovima sveta: u Australiji, Novom Zelandu, Brazilu, Meksiku, SAD-u, Kanadi, Rusiji, Francuskoj, Holandiji, pa i u zemljama u našem okruženju kao što su Italija, Rumunija, Mađarska i Slovenija. Nova GII.17 varijanta norovirusa, nazvana Kawasaki 2014, je filogenetski različita od prethodne GII.17 varijante. Moguće je da je ova nova varijanta GII.17 stekla jači epidemijski kapacitet, odnosno, da ima veću biološku adaptivnost (90,91).

2.2.4. Otpornost norovirusa

Norovirus je vrlo otporan na promene temperature tako da može da izdrži temperaturu od 60°C tokom 30 minuta, a stabilan je i na niskim temperaturama (-70°C). Otporan je na dejstvo etra, hlora, deterdženata, kao i na sušenje. Podnosi pH 2,7 do 3 sata (29).

2.2.5. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike norovirusne infekcije

Smatra se da je 60-85% svih epidemija gastroenteritisa uzrokovano norovirusom, posebno na teritoriji SAD, Evropskih država i Japana (92,93). Za zemlje severne hemisfere, norovirusne epidemije i pojedinačni slučajevi akutnog gastroenteritisa pokazuju sezonsko pojavljivanje, uglavnom tokom zimskih meseci (26,93,94).

Norovirus se prenosi direktnim kontaktom (fekalno-oralnim putem), hranom, vodom, aerosolom kod povraćanja, kao i kuhinjskim površinama, koje su kontaminirane (85). Koncentracija dezinfekcionih sredstava, koja se koriste protiv bakterija, nije dovoljna za eliminaciju i inaktivaciju norovirusa (26).

Ovaj virus je jedan od najznačajnijih uzročnika gastroenterokolitisa širom sveta. U SAD-u, gde spada u najčešće uzročnike dijarealnog sindroma, navedeno je da izaziva 26% hospitalizacija (radi se o težim oblicima bolesti) i 11% smrtnih slučajeva, nakon gastroenterokolitisa izazvanih kontaminiranom hranom (93). Prema podacima Centra za prevenciju i kontrolu bolesti (CDC) norovirusi su uzročnici u 58% svih oboljenja izazvanih hranom (salata, voće, termički neobrađena hrana i školjke), kao i zagađenom vodom. To su najčešći uzroci nastanka infekcija (95).

Infektivne doze virusa su niske (1 do 10 virusnih partikula), a viruse izlučuju i simptomatski i asimptomatski oboleli. Bolest nastaje najčešće 24 do 48h, posle konzumiranja zaražene vode i hrane. Počinje povraćanjem, koje je vrlo izraženo. Pored povraćanja, koje je eksplozivno, postoji muka, grčevi i vodenaste stolice, koje nisu krvave. Može postojati temperatura, jeza, glavobolja i bolovi u mišićima. Teža klinička slika sa dehidratacijom je česta kod dece, starih, imunodeficitarnih i hroničnih bolesnika. Oko 30% inficiranih norovirusom ne moraju da imaju nikakve simptome, ali izbacuju velik broj virusa u stolici, pa se tako širi infekcija. Simptomi obično traju oko 2 dana. Kod težih bolesnika i imunodeficitarnih osoba bolest traje duže i oporavak je postepen (26).

Hrana može da se kontaminira prilikom gajenja, zalivanja, đubrenja, zatim kontaminiranom vodom i otpadnim materijalom. Infekcija može da nastane unošenjem hrane koja se termički ne obrađuje, a zagađena je od ljudi koji je spremaju (često u restoranima, hotelima, školama, bolnicama, kampovima, brodovima za krstarenje). Infekcija se prenosi i školjkama i morskim plodovima, koji se gaje u kontaminiranoj vodi. Zabeležene su pojave epidemija posle elementarnih nepogoda i poplava (26,80).

Prevalenca genotipova, koji su najčešći uzročnici infekcija, razlikuje se u različitim regijama i populacijama. Pokazalo se, takođe, da se pojedini genotipovi češće prenose na određene načine. Tako se genotip GII.4 češće prenosi direktnim kontaktom osobe sa osobom, dok kod nekih drugih genotipova kao što su GI.3, GI.6, GI.7, GII.3, GII.6 i GII.12 češći je prenos preko kontaminirane hrane. Genotipovi genogrupe I češće se prenose vodom ili hranom nego što je to slučaj kod genogrupe II. To može da ukazuje na veću stabilnost genogrupe I na uticaj faktora spoljašnje sredine od genogrupe II. Pošto norovirus može da se prilagodi faktorima domaćina koji se razlikuju u zavisnosti od populacije koja je zaražena, kao što su starost, zdravlje i imunološki status, razlike u epidemiologiji genotipova norovirusa u različitim zajednicama mogu verovatno uticati na evoluciju genotipova (87).

Infekcije ljudi izazvane životinjskim norovirusima do sada nisu prijavljene, ali postoje dokazi, koji ukazuju na moguć prenos norovirusa među različitim vrstama domaćina. Tako su humani norovirusi otkriveni u stolici svinja, goveda i pasa. Isto tako, serumska antitela protiv

norovirusa goveda i pasa su otkrivena kod ljudi, i to sa višim titrovima kod veterinara nego u opštoj populaciji (87).

Ranije se zaključivalo o bolesti na osnovu kliničke slike (u kojoj dominira povraćanje), trajanja inkubacije i trajanja bolesti, kao i činjenice da nije dokazana bakterijska infekcija (tzv. „Kaplanovi kriterijumi“) (96). Danas se još uvek u dijagnostici koristi i serološko dokazivanje virusnih antigena (ELISA testom), pri čemu je efikasnost ove metode oko 55%. Za dijagnostiku je bolje koristiti elektronsku mikroskopiju (pri čemu u jednom gramu stolice treba da ima bar 10^6 virusa da bi on bio identifikovan). „Zlatni standard“ u dijagnostici je *RT-PCR* test (reverzna transkripcija *PCR* test), jer se ovim testom može utvrditi virus, čak i u maloj količini, a mogu se razlikovati i genogrupe i genotipovi, što ima značaj u epidemiološkim istraživanjima nastanka infekcije (26,97).

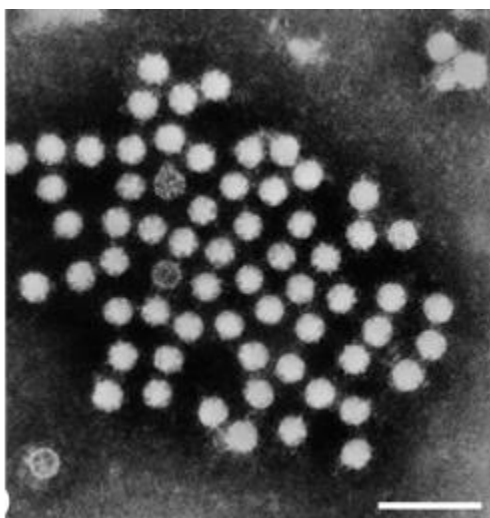
Od norovirusa obolevaju svi uzrasti, mada češće starije osobe, kao i deca starija od 5 godina. Imunitet, koji ostaje posle preležane bolesti je kratak i već za nekoliko meseci može da nastane nova infekcija. Takođe, zbog velike raznovrsnosti norovirusnih tipova i nedostatka potpunog unakrsnog imuniteta, ponovljene infekcije norovirusom javljaju se više puta tokom života (85).

Za razliku od rotavirusa, protiv norovirusa ne postoji vakcina u prevenciji nastanka bolesti. Jedna od najvažnijih prepreka u razvoju norovirusne vakcine je nemogućnost njegove kultivacije u kulturi ćelija i nedostatak malog životinjskog modela, sličnog čoveku po osobinama i reagovanju, na kome bi se mogao ispitivati humani norovirus. Dobijanje norovirusnih čestica sličnih virusu (VLP) omogućilo je značajan napredak u dobijanja vakcine protiv norovirusa (86). Kod prvih napravljenih norovirusnih vakcina završene su faze I i II kliničkih ispitivanja. Ove vakcine se zasnivaju na VLP-ovima genotipa GI.1 ili, u slučaju bivalentne vakcine, sadrže VLP-ove i genotipa GI.1 i VLP-ove izvedene na osnovu konsenzusa nekoliko GII.4 varijanti. Klinička ispitivanja pokazala su pojavu indukcije imunološkog odgovora (stvaranje antitela) bez obzira na način davanja vakcine (intramuskularno, oralno ili intranazalno). U kliničkom ispitivanju sa zdravim dobrovoljcima, intramuskularna vakcinacija sa bivalentnim VLP-om nije značajno smanjila učestalost bolesti nakon planiranog kontakta sa GII.4 genotipom norovirusa. Međutim, vakcinacija je uspela da smanji incidenciju i ozbiljnost povraćanja i dijareje. Razvoj vakcine protiv norovirusa je komplikovan visokim stepenom genetičke raznovrsnosti i visokom stopom antigenske evolucije norovirusa. Ove komplikacije mogu značiti da će biti neophodno ažurirati vakcinu svakih 2-3 godine, kao što je slučaj sa vakcinama protiv gripa, osim ako se ne napravi vakcina koja će biti u stanju da izazove imunološki odgovor u vidu široko reaktivnih antitela, efikasnih na nove antigenske varijante (87).

1.4. Astrovirus

2.3.1. Morfologija i struktura astrovirusa

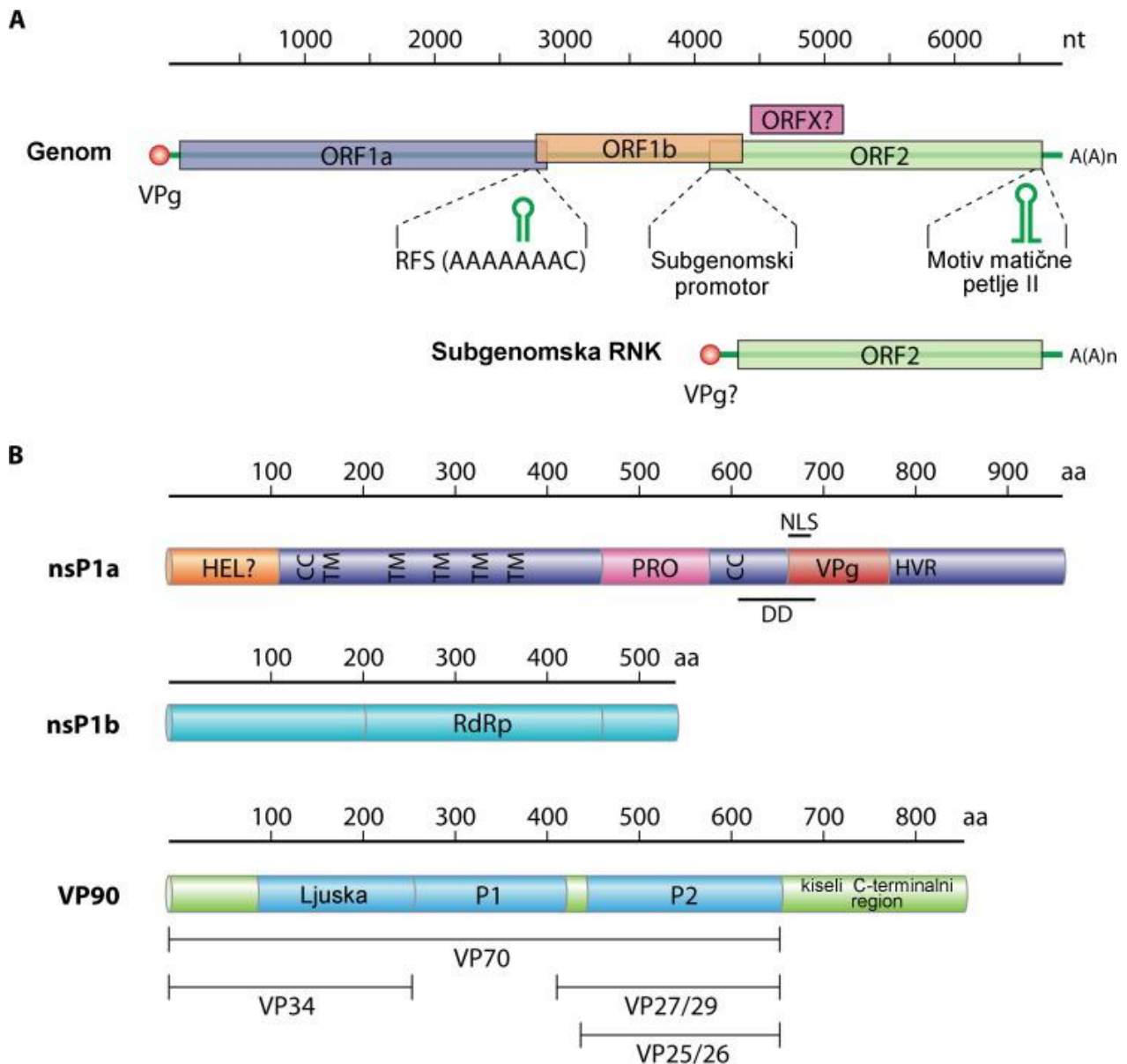
Spada u porodicu *Astroviridae*. *Appeton* i *Higgins* su 1975. godine, posmatrajući pod elektronskim mikroskopom uzorke stolice dece sa dijarejom i povraćanjem, zapazili partikule veličine 28-30 nm (98). Iste godine, *Madeley* i *Cosgrove* koriste termin astrovirus da bi opisali male okrugle viruse sa karakterističnim oblikom zvezde (astron na grčkom znači zvezda), koje su našli u uzorcima stolica hospitalizovane odojčadi sa gastroenteritisom (99).



Slika 8. Humani astrovirusi iz uzorka stolice posmatran pod elektronskim mikroskopom (adaptirano prema referenci 100)

Veličina virusne čestice je 27-30 nm. Ikozaedarne (kubične) je simetrije. Virus nema drugi omotač, osim kapsida, zbog čega je otporan u spoljnoj sredini (30). Virusni genom čini pozitivan lanac jednolančane RNK veličine oko 6.8 kb, koji se sastoji iz tri otvorena okvira za čitanje (ORF1a, ORF1b i ORF2). Vg protein je kovalentno vezan za 5' kraj, dok je 3' kraj poliadenilovan. ORF1a i ORF1b kodiraju nestrukturane proteine: nsP1a i nsP1b, koji predstavlja RNK zavisnu RNK polimerazu. Nestrukturani proteini učestvuju u transkripciji i replikaciji RNK. Tokom ciklusa replikacije, u inficiranim ćelijama se stvara pozitivan lanac jednolančane subgenomske RNK na 3' kraju genomske RNK (ORF2 region), koji kodira strukturne proteine viriona. ORF2 kodira strukturni protein VP90. Smatra se da je VP90 protein inicijalno sastavni deo nezrelih viriona. Ćelijske kaspaze dodatno cepaju ovaj protein na C-terminalnom kraju, pri čemu se dobija virusni kapsidni protein VP70. Konačno, virusne čestice, koje sadrže VP70, kada se oslobode iz ćelija, bivaju proteolitički obrađene tripsinom, radi povećanja infektivnosti (dobijaju se proteini VP34, VP27/29 i VP25/26) (slika 9) (100). Obrada VP90 do VP70 pomoću kaspaza zahteva da virusi

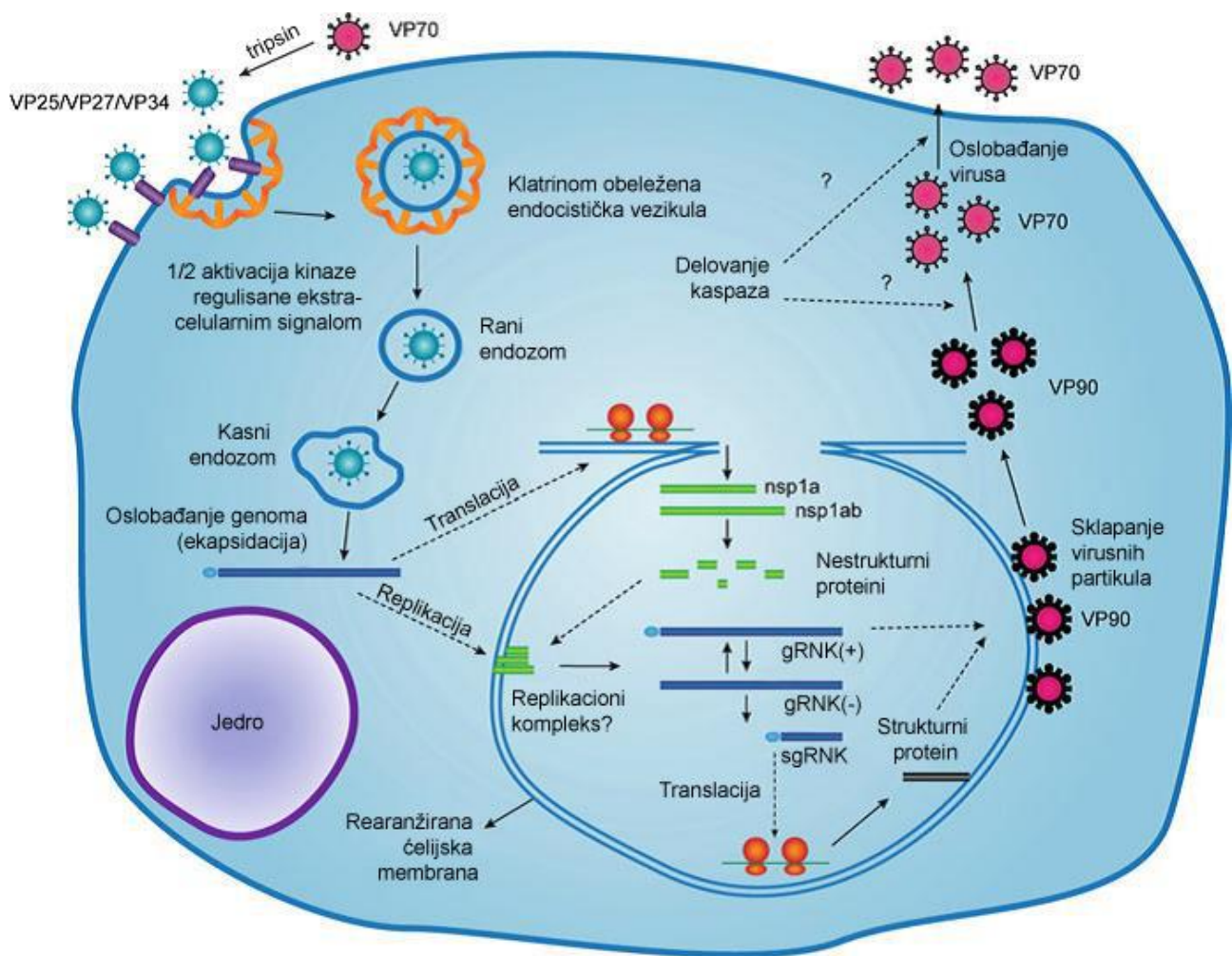
napuste ćelije. Izgleda da se ovo oslobađanje čestica sa VP70 u ekstracelularnu sredinu javlja bez lize ćelija. Dužina ORF1a, ORF1b i ORF2 razlikuje se kod različitih vrsta astrovirusa. Ove varijacije u dužini uglavnom su posledica insercija i delecija na 3' kraju ORF1a. Isto tako, regioni preklapanja različitih ORF-ova, variraju u zavisnosti od vrste astrovirusa. Ribozomalni signal za pomeranje okvira za čitanje (RFS), bitan za stvaranje RNK zavisne RNK polimeraze, koju kodira ORF1b, prisutan je upravo u ovom preklapajućem regionu. Preklapanje između ORF1b i ORF2 može da varira u dužini ili da ne postoji, što je slučaj kod pačijeg astrovirusa (100,101).



Slika 9. Organizacija genoma i produkcija proteina kod humanih astrovirusa (adaptirano prema referenci 100)

2.3.2. Replikacija astrovirusa

Posle vezivanja za jedan ili više ćelijskih receptora, ulazak virusa u ćeliju se odvija preko klattrin-zavisne endocitoze. Ulazak virusa u ćeliju zavisi i od pada pH i sazrevanja endozoma, gde se dekapsidacija virusa odvija. Smatra se da VPg protein na 5' kraju virusnog genoma ima ulogu u infektivnosti virusa, jer vrši aktivaciju ćelijskih faktora, koji započinju translaciju. Dva glavna nestrukturna poliproteina, nsP1a i nsP1a1b, stvaraju se tokom translacije genomske RNK i zatim se cepaju pod dejstvom virusnih i ćelijskih proteaza, što dovodi do nastanka zrelih nestrukturnih proteina (nsP), koji su potrebni za replikaciju genoma. Replikacioni kompleksi se sklapaju u bliskoj saradnji sa intracelularnim membranama. Smatra se da protein nsP1a/4 ili jedan od njegovih prekursora (što bi uključivalo VPg domen) može reagovati sa RNK zavisnom RNK polimerazom i doprineti regulaciji sinteze negativnog lanca RNK, koji služi kao šablon za sintezu nove genomske i subgenomske RNK. Subgenomska RNK, koja se stvara u velikim količinama, koriste se za stvaranje kapsidnih proteina. Strukturni VP90 poliprotein se inicijalno sastavlja u nezrele virione u saradnji sa intracelularnim membranama. Nekoliko ćelijskih kaspaza dalje cepa ove VP90 poliproteine, kada se oni odvoje od membrana, što dovodi do nastanka VP70 nezrelih virusnih kapsida. Oslobođanje čestica VP70 izgleda se odvija bez lize ćelija, a virioni sazrevaju ekstracelularno dejstvom tripsina (slika 10) (100,102).

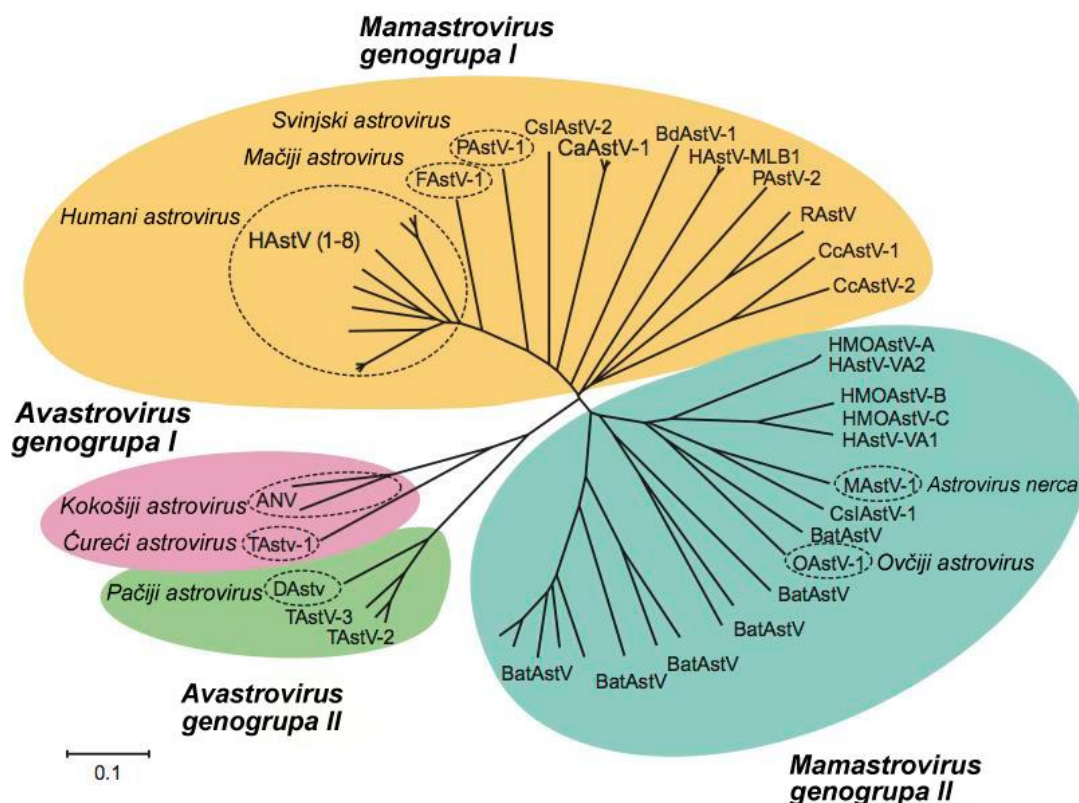


Slika 10. Šematski prikaz životnog ciklusa astrovirusa (adaptirano prema referenci 102)

2.3.3. Klasifikacija i raznovrsnost astrovirusa

U početku, familiju *Astroviridae*, na osnovu morfologije viriona, činio je samo jedan rod *Astrovirus* (103). Međutim, kasnije su utvrđena dva roda i to na osnovu porekla domaćina: *Mamastrovirus* (astrovirusi različitih sisara, pa i čoveka) i *Aviastrovirus* (astrovirusi izolovani iz ptica). Klasifikacija unutar svakog roda na "virusne vrste" ili "genotipove", zasnovana je na vrsti domaćina, ali i na genetskim razlikama u kompletnoj sekvenci kapsida. Do 2008. godine smatralo se da infekcije kod ljudi izazivaju samo tzv. „klasični“ humani astrovirusi (HAstV), među kojima je bilo 8 serotipova (100). Prvi novi astrovirusi otkriveni su 2008. godine u uzorcima stolice dece iz Melburna i nazvani su astrovirusi MLB (HAstV-MLB)(104). Do sada je izolovano nekoliko ovih virusa (MLB1, MLB2, MLB3) iz uzoraka stolice dece iz Australije, Amerike, Indije, Meksika, Turske, Egipta, Kine i Evrope (104-107). U 2009. godini druga grupa humanih astrovirusa je otkrivena u uzorcima stolice dece sa dijarejom iz Virdžinije (VA) i iz Nigerije, Pakistana i Nepala (HMO – skraćena za ljude, kune i ovce, jer su virusi slični virusima kod ovih domaćina)

(108,109). Do sada su 4 VA/HMO astrovirusa opisana i to u Nigeriji, Pakistanu, Nepal, Americi, Egiptu i Kini, ali oni nisu izolovani u Evropi (100,108-110).



Slika 11. Filogenetsko stablo porodice Astroviridae (adaptirano prema referenci 111)

2.3.4. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike astrovirusne infekcije

Astrovirus izaziva obično sporadične slučajeve gastroenterokolitisa, najčešće kod dece od 2 do 4 godine, iako je bolest dokazana i kod starijih i imunodeficitarnih osoba. Incidenca astrovirusnih infekcija, koje su najčešće izazvane „klasičnim“ humanim astrovirusima, kreće se od 2 do 9%, kako u razvijenim, tako i u zemljama u razvoju, pri čemu je serotip 1 najčešći uzročnik bolesti (100,112) Infektivna doza je niska, a inkubacija iznosi 10 do 70 sati nakon konzumiranja kontaminirane hrane ili vode. Virus se prenosi fekalno-oralnim putem, ili preko kontaminirane hrane i vode. Bolest je obično blaga, sa simptomima sličnim rotavirusnom gastroenterokolitisu (muka, povraćanje, dijareja, abdominalni bol, glavobolja, temperatura, malaksalost). Simptomi prolaze nakon 2 do 9 dana. U predelima sa umerenom klimom bolest nastaje češće zimi, a u tropskim predelima u kišnoj sezoni (26,100).

Generalno gledano, astrovirusne infekcije su ograničene na gastrointestinalni trakt. Najčešće nastaju simptomatski slučajevi bolesti, koja se javlja pretežno kod mladih osoba. Međutim,

ekstraintestinalne simptomatske i asimptomatske infekcije takođe su opisane, kako kod sisara, tako i kod ptica, što ukazuje na to da tropizam ovih virusa može biti širi nego što se prvobitno mislilo (100).

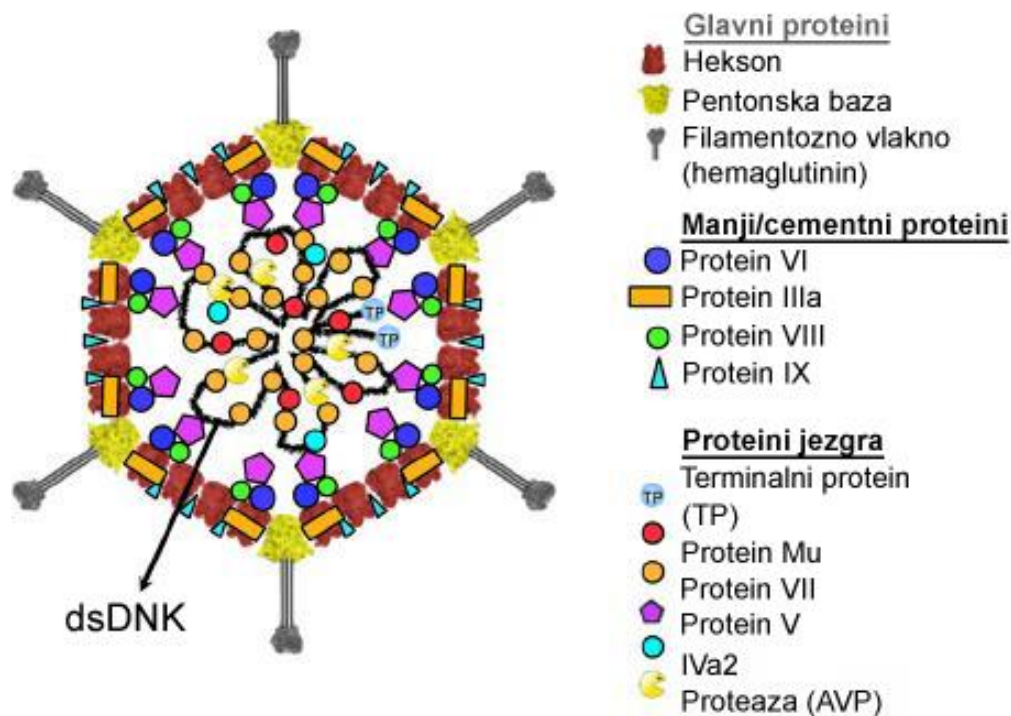
Dijagnoza se postavlja elektronskom i imunoelektronskom mikroskopijom, kao i *RT-PCR* testom, dok su serološki testovi manje osetljivi, kao što je rečeno i za dijagnostiku ostalih virusnih uzročnika gastroenterokolitisa (26,98).

1.5. Enterični adenovirusi

2.4.1. Morfologija i struktura adenovirusa

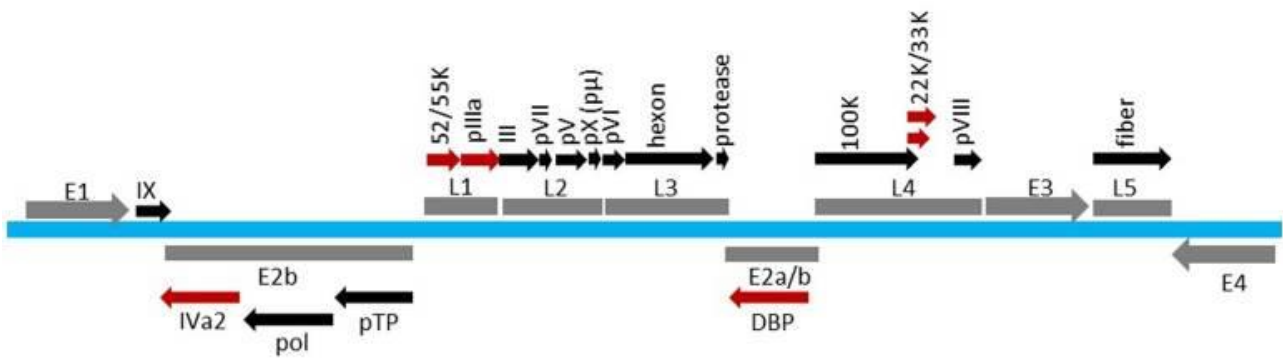
Spadaju u porodicu *Adenoviridae*, rod *Mastadenovirus* (humani adenovirusi - HAdV su podeljeni u 7 grupa od A do G, ukupno 57 tipova). Naziv *Adenoviridae* potiče od grčke reči aden, što znači žlezda, jer su prvi humani adenovirusi bili izolovani iz adenoidnog tkiva. Naime, Rowe sa saradnicima 1953. godine pokušao je da izoluje uzročnika iz hirurški odstranjenog adenoidnog tkiva kod dece. Smatrao je da je citopatogeni efekat, koji je uočen u uzorcima adenoidnog tkiva, nastao od nepoznatog mikroorganizma, koga su nazvali „uzročnik degeneracije adenoida“ (113). Nekoliko godina kasnije (1956. godine) čitava porodica dobila je naziv prema tkivu iz koga je virus prvi put izolovan (*Adenoviridae*) (114).

Veličina virusne čestice je 70-100 nm. Ikozaedarne (kubične) su simetrije. Imaju 252 kapsomere, od kojih su 240 heksagonalne i nalaze se na stranicama i ivicama ikozaedara. One sadrže grupno specifične epitope. Na uglovima se nalazi 12 pentagonalnih kapsomera, od kojih polaze duga vlakna, dužine 10-30 nm, za koja je vezan hemaglutinin (filamentozno vlakno). Pentagonalne kapsomere nose dominantne epitope, specifične za tip virusa (30,115). Heksoni sadrže proteine II, VI, VIII i IX, koji učestvuju u stabilizaciji i sastavu virusne čestice. Proteini pentona (III i IIIa) imaju funkciju penetracije u ćeliju, a hemaglutinini su odgovorni za vezivanje virusa za receptore. Postoji najmanje osam proteina koji čine jezgro. Oni zadržavaju integritet genoma i učestvuju u enzimskoj aktivnosti (3). Virusni genom čini linearna dvolančana dezoksiribonukleinska kiselina (DNK). Virion, osim kapsida, nema drugi omotač, zbog čega je otporan u spoljnoj sredini (30). Iako svi adenovirusi imaju sličnu morfološku građu, organizacija genoma se razlikuje između virusa različitih rodova.



Slika 12. Strukturni model adenovirusa (adaptirano prema referenci 116)

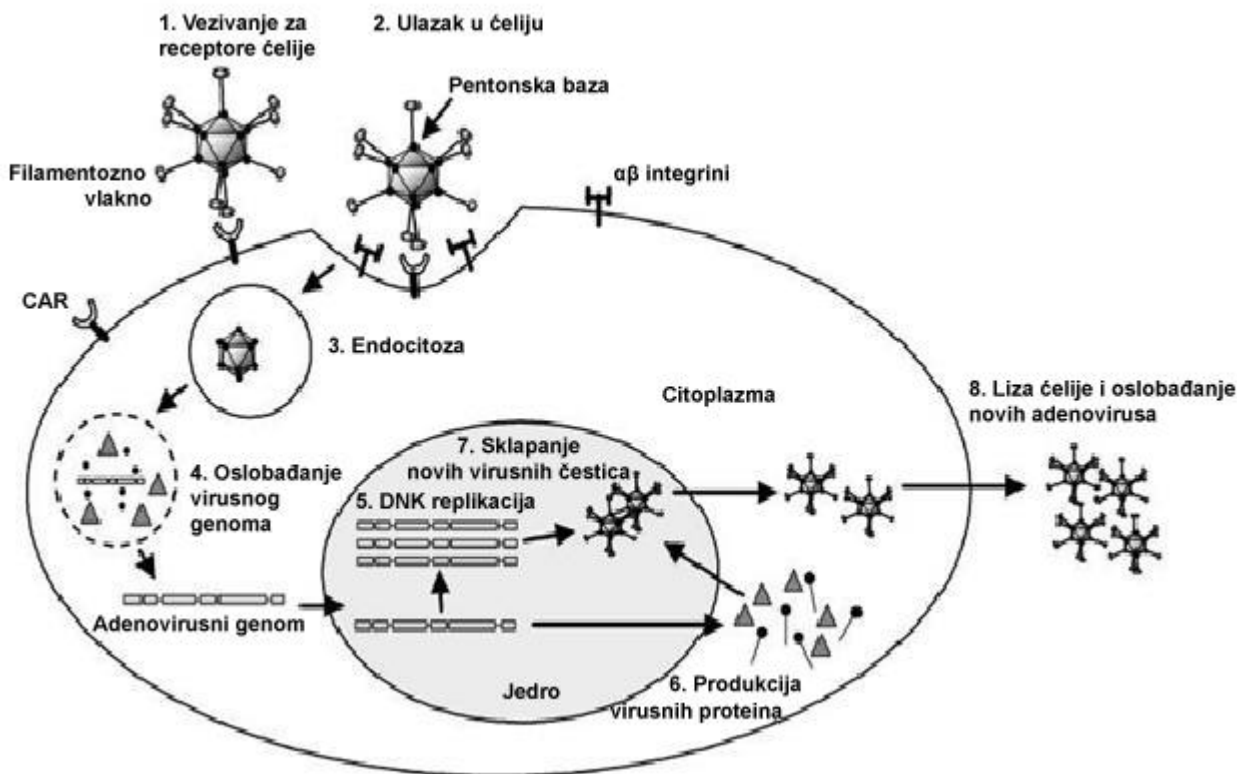
Genom adenovirusa čini linearna dvostrana DNK dužine oko 36 kb. Genom se prepisuje sa oba lanca i u oba smera, ali u različito vreme. Genom kodira sintezu preko 40 proteina. Adenovirusni regioni za kodiranje naznačeni su kao rani ili kasni u zavisnosti od toga kada su izraženi tj. pre ili posle replikacije DNK. Regioni za rano prepisivanje E1A, E1B, E2, E3 i E4 su prvi regioni, koji se prepisuju i kodiraju proteine uključene u aktiviranje transkripcije drugih virusnih regiona i menjanje ćelijske okoline radi promovisanja umnožavanja virusa. E1A proteini indukuju mitogenu aktivnost u ćeliji domaćina i stimulišu ekspresiju drugih virusnih gena. E2 proteini posreduju u replikaciji virusne DNK, dok E3 i E4 proteini menjaju imunološki odgovor domaćina i ćelijsku signalizaciju. Aktivacija glavnog kasnog promotera (MLP), nakon početka umnožavanja virusne DNK, dozvoljava ekspresiju kasnih gena, koji kodiraju prvenstveno virusne strukturne proteine. Kasni regioni (L1-L5) se prepisuju iz alternativnog transkripta. Postoje i četiri mala produkta, proizvedena u intermedijarnom/kasnom vremenu infekcije, uključujući strukturni protein IX (pIX) i IVa2 protein, koji pomaže u pakovanju virusne DNK u nezrele virione. Kasni proizvodi, VA RNA I i II (virusne ribonukleinske kiseline – engl. *virus associated-ribonucleic acid*), inhibiraju aktivaciju interferonskog odgovora, ometaju ćelijsku mikro-RNK obradu i mogu uticati na ekspresiju gena domaćina. Na oba kraja u genomu nalazi se ponavljajući obrnuti sled (ITR – engl. *inverted terminal repeat*) od 100 bp, na koji je kovalentno vezan terminalni protein (TP – engl. *terminal protein*), koji je neophodan za početak virusne replikacije (117).



Slika 13. Šematski prikaz genoma adenovirusa (adaptirano prema referenci 118)

2.4.2. Replikacija adenovirusa

Replikativni ciklus adenovirusa podjeljen je u dve faze: ranu i kasnu fazu. Rana faza obuhvata vezivanje virusa za ćeliju, ulazak virusa u ćeliju, dekapidaciju, kao i sve događaje do same sinteze virusne DNK. U ranoj fazi dolazi do pripreme optimalnih uslova za umnožavanje virusne DNK u ćeliji domaćina. Virus se vezuje za ćeliju preko filamentoznog vlakna (hemaglutinina). Dva receptora za koje se vezuju adenovirusi su CD46 za grupu B i koksaki adenovirusni receptor (CAR - engl. *coxsackievirus adenovirus receptor*) za pripadnike ostalih grupa. Nakon vezivanja virusa za ćeliju, deo pentonske baze ulazi u interakciju sa integrinskim molekulima na površini ćelije. Ova interakcija inicira aktinsku polimerizaciju, što je ključno u započinjanju ulaska virusa u ćeliju endocitozom. Nizak pH endozoma dovodi do brzog premeštanja virusa iz endozoma u citoplazmu. U citoplazmi dolazi do uklanjanja kapsidnih proteina i, nakon toga, viruna DNK ulazi u jedro ćelije kroz mikrotubule. Tokom rane transkripcije prvo se aktiviraju rani geni (E1-E4). Uloga gena rane faze je da omoguće da ćelija uđe u S fazu, fazu u kojoj se sintetiše ćelijska DNK, zatim da uspostave zaštitu inficirane ćelije od antivirusne odbrane domaćina i da sintetišu virusne produkte, neophodne za replikaciju virusne DNK. Nakon što se stvori dovoljna količina virusnih proteina i replikativnih supstrata, dolazi do kasne faze replikacije. Stvaranje nove virusne DNK odvija se u jedru ćelije. Terminalni protein na kraju genoma služi kao prajmer, odnosno, kao početno mesto DNK polimerazi tokom repikacije. Nakon umnožavanja virusne DNK prepisuju se kasni geni (L1-L5), koji kodiraju sintezu strukturnih proteina virusa. Stvorene iRNK prenose se u citoplazmu, gde se vrši sinteza virusnih proteina, koji se nakon toga vraćaju u jedro. U jedru dolazi do sklapanja novih virusnih čestica. Prvo se stvaraju prazni kapsidi, od prethodno stvorenih heksona i pentona, a zatim se u kapside umeću virusna DNK i proteini središnjeg dela virusa. Na kraju se zreli virioni oslobađaju iz ćelije lizom ćelije domaćina (117,119,120).



Slika 14. Šematski prikaz replikacionog ciklusa adenovirusa (adaptirano prema referenci 120)

2.4.3. Klasifikacija i raznovrsnost adenovirusa

Adenovirusi pripadaju porodici *Adenoviridae*, koja je podijeljena u 5 rodova, prema poslednjoj međunarodnoj klasifikaciji virusa (engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses 2016 - ICTV*). Podela je u zavisnosti od domaćina: *Mastadenovirus* (patogeni za sisare), *Aviadenovirus* (patogeni za ptice), *Atadenovirus* (patogeni za zmije, guštere, patke, preživare), *Siadenovirus* (patogeni za vodozemce) i *Ichtadenovirus* (patogeni za ribe) (121).

Rod *Mastadenovirus* obuhvata 57 humanih serotipova, koji su podeljeni u 7 grupa (A-G) (122). Ovi tipovi se u velikoj meri razlikuju u tropizmu i patogenosti. Mogu da inficiraju humani respiratorni, urinarni ili gastrointestinalni trakt, kao i konjunktivu, što može da uzrokuje niz oboljenja, uključujući pneumoniju, bronhitis, keratokonjunktivitis, gastroenteritis i cistitis (30,115).

Sa gastroenterokolitisom povezani su tipovi 40 i 41 (iz grupe F), koji se i nazivaju enterični adenovirusi. Ređe se pominju tipovi 12, 18, 31 (iz grupe A) i tipovi 1,2,5 i 6 (iz grupe C), kao mogući uzročnici gastrointestinalnih tegoba, ali retko (3,122,123).

Tabela 3. Klasifikacija humanih adenovirusa prema grupama, serotipovima i mestima infekcije (adaptirano prema referenci 122)

Grupe	Serotipovi	Mesta infekcije
A	12, 18, 31	Respiratorni, urinarni, gastrointestinalni trakt
B	3,7,11,14,16,21,34,35,50,55	Respiratorni, urinarni, gastrointestinalni trakt i oči
C	1,2,5,6,57	Respiratorni, urinarni, gastrointestinalni trakt
D	8,9,10,13,15,17,19,20,22,23,24, 25,26,27,28,29,30,32,33,36, 37,38,39,42,43,44,45,46,47,48, 49,51,53,54,56	Oči, gastrointestinalni trakt
E	4	Oči, respiratorni trakt
F	40,41	Gastrointestinalni trakt
G	52	Gastrointestinalni trakt

2.4.4. Klinička slika bolesti i epidemiološke karakteristike adenovirusne infekcije

Adenovirusi izazivaju uglavnom respiratorne infekcije, uz istovremeno zahvatanje i limfnih žlezda. Međutim, navedeni enterični tipovi su uzročnici u 5 do 20% slučajeva gastroenterokolitisa najčešće kod male dece. Navode se čak kao drugi po učestalosti uzročnici gastroenterokolitisa kod male dece, odmah iza rotavirusa (115).

Prenose se fekalno-oralnim putem, kao i kontaminiranom hranom i vodom. Moguće je i respiratorno prenošenje ovih tipova. Infektivna doza virusa je mala (26). Inkubacija iznosi 8 do 10 dana i bolest je obično blaga. Slični simptomi nastaju kao i kod drugih virusnih gastroenterokolitisa (dijareja, muka, povraćanje, abdominalni bol). Bolest traje obično 7 do 8 dana. Serotipovi 40 i 41 serogrupe F su najčešće dijagnostikovani (124).

Dijagnoza se postavlja imunoelektronskom mikroskopijom i *PCR* testom, dok su serološki testovi manje osetljivi. Za razliku od drugih tipova adenovirusa, ovi tipovi se ne mogu kultivisati na kulturama ćelija (3,26).

Adenovirusi su među prvim virusima izabrani kao vektori za upotrebu u genskoj terapiji naslednih bolesti i malignih procesa kod ljudi. Prilikom dizajniranja vektora adenovirusa za gensku

terapiju, virus mora biti „razoružan“ oštećenjem njegovog sistema replikacije. Virus treba da zadrži sposobnost prodiranja u ćeliju i unošenja svoje DNK, a sa druge strane, pacijent ne sme da trpi zbog infekcije adenovirusom. Ovo se radi brisanjem gena za E1A protein, virusni protein koji se sintetiše odmah po nastanku infekcije i koji je neophodan za razmnožavanje virusa. Terapijski geni zamenjuju region E1. Na taj način virus postaje idealan za prenošenje gena, ali više nije u stanju da se razmnožava. Na ovaj način dolazi se do vektora, koji može poslužiti za gensku terapiju (120).

Takođe treba navesti da su dosta često opisane i udružene infekcije ovim virusima, uzročnicima dijarealnog sindroma (rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima) (125-128).

Veoma je značajno da se brzo i efikasno postavi tačna etiološka dijagnoza dijarealnog sindroma, kako bi se na vreme mogle preduzeti adekvatne mere, odgovarajući tretman obolelog i prevencija širenja virusnog gastrointestinalnog sindroma.

1.6. Virusi od diferencijalno dijagnostičkog značaja

Već je rečeno da se razni virusi, pored navedenih kao glavnih uzročnika virusnog gastrointestinalnog sindroma, mogu uneti preko usta, dospeti u gastrointestinalni trakt i izazvati digestivne tegobe. Takav je naprimer **Hepatitis A virus** (porodica *Picornaviridae*, rod *Hepatitis virus*), koji se, međutim, nakon unošenja preko usta u gastrointestinalni trakt i izazivanja digestivnih tegoba, širi krvlju do hepatocita, gde se umnožava prema svome tropizmu. Zatim virus, putem žuči, ponovo dolazi u gastrointestinalni trakt. Simptomi su: muka, povraćanje, dijareja, gubitak apetita, malaksalost, bolovi u mišićima, temperatura. Diferencijalno dijagnostički značajno je zapaziti nastanak hepatitisa i pojavu žutice (28,29).

Hepatitis E virus (porodicu *Hepeviridae*, rod *Hepevirus*), takođe može da se prenosi fekalno-oralnim putem, alimentarnom i hidričnom transmisijom. Simptomi od strane gastrointestinalnog trakta su blaži nego kod infekcije hepatitis A virusom. Pošto se infekcija hepatitis E virusom može preneti na sličan način, kao i virusi uzročnici akutnog gastroenterokolitisa (fekalno-oralnim putem, hranom koja je nedovoljno kuvana, preko otpadnih materija, korišćenih za đubrenje, zagađenom vodom itd.), bitno je isključiti i ovaj virus, odnosno, tačno postaviti etiološku dijagnozu akutnog virusnog gastroenterokolitisa. *RT-PCR* test je metod izbora za brzo i tačno postavljanje dijagnoze. Oba virusa hepatitisa, i A i E, su mali RNK virusi, čiji genomi su jednolančane RNK, koje imaju pozitivan lanac (28,29).

U diferencijalnoj dijagnostici akutnog dijarealnog sindroma treba imati u vidu da sporadične gastroenterokolitise, slične norovirusnim infekcijama može da izazove **Sapovirus** (porodica *Caliciviridae*, rod *Sapovirus*). Infekcije Sapovirusom su retke i javljaju se češće kod dece ispod 5

godina, nego u drugim starosnim grupama. To je mala virusna čestica (veličine 35-40 nm), ikozaedarne (kubične) simetrije, čiji genom čini pozitivan lanac jednolančane RNK. Virus nema drugi omotač, zbog čega je otporan u spoljnoj sredini. Ima 5 genogrupa. Genogrupe I, II, IV i V izazivaju bolesti kod ljudi i klinički simptomi su blaži.

Infektivna doza virusa je mala. Inkubacija traje 1 do 3 dana. Virus se prenosi fekalno-oralnim putem. Bolest nastaje nakon konzumiranja kontaminirane hrane ili vode, kao i direktnog kontakta sa obolelom osobom. Simptomi, koji nastaju su muka, povraćanje, dijareja, abdominalni bol...

Dijagnoza se postavlja imunoelektronskom mikroskopijom i *RT-PCR* testom, dok su serološki testovi manje osetljivi (26).

Coronavirusi (porodica *Coronaviridae*, genus *Coronavirus*) uzročnici su pretežno infekcija respiratornog trakta, a vrlo retko mogu da izazovu gastroenteritise i to obično kod dece do 2 godine. Radi se o virusima helikalne simetrije, veličine 80 do 120 nm, sa genomom u vidu jednolančane RNK, koja ima pozitivan lanac. Virus je obavijen omotačem sa dugim peplomerama, koje liče na cvetne latice. Generalno rečeno, Coronavirus nema značajniju ulogu u diferencijalnoj dijagnostici akutnog gastrointestinalnog sindroma (3,26,28).

Torovirusi (porodica *Coronaviridae*, genus *Torovirus*) su prvi put otkriveni u fecesu obolelih od gastroenteritisa 1984. godine. Ovi virusi, veličine 100 do 140 nm, imaju helikalnu simetriju i genom u vidu jednolančane RNK u vidu pozitivnog lanca. Povezuju se sa akutnom dijarejom kod dece (3,12).

Picobirnavirusi (porodica *Picobirnaviridae*, genus *Picobirnavirus*) su mali virusi (30 do 40nm) bez drugog omotača i sa ikozaedarnom (kubičnom) simetrijom. Genom čini dvolančana RNK, koja ima dva ili tri segmenta. Prvi put su otkriveni 1988. godine i od tada izolovani su kod različitih životinjskih vrsta. Kod ljudi se navode kao uzročnici dijareje kod imunodeficitarnih osoba, ali su izolovani i kod dece i odraslih imunokompetentnih osoba sa dijarejom (3,12).

U diferencijalnoj dijagnostici kod akutnog gastroenterokolitisa pominje se i humani **Bocavirus** (porodica *Parvoviridae*, rod *Bocavirus*), koji je primarno uzročnik infekcija donjih delova respiratornog trakta, ali se navodi da može da izazove i sporadične slučajeve gastroenterokolitisa kod dece i odraslih. To je mala virusna čestica (veličine 18-26 nm), ikozaedarne (kubične) simetrije, sa genomom u vidu jednolančane DNK. Virus nema drugi omotač, zbog čega je otporan u spoljnoj sredini (26).

Sa sporadičnim slučajevima gastroenterokolitisa kod dece i odraslih u Azijskim zemljama i u Brazilu, povezuje se i **Aichi virus** (iz porodice *Picornaviridae*, rod *Kobuvirus*). To je mala

virusna čestica (veličine 24-30 nm), ikozaedarne (kubične) simetrije, sa genomom u vidu pozitivnog lanca jednolančane RNK. Virus nema drugi omotač, zbog čega je otporan u spoljnoj sredini (12,26).

Međutim, svi nabrojani virusi, navedeni kao uzročnici koji mogu imati neki značaj u diferencijalnoj dijagnostici virusnog gastrointestinalnog sindroma, razlikuju se po mnogim parametrima od rota, noro, astro i enteričnih adenovirusa, glavnih uzročnika virusnog dijarealnog sindroma.

Već je ranije rečeno da **Enterovirusi** (porodica *Picornaviridae*, genus *Enterovirus*) izazivaju čitav spektar kliničkih manifestacija, a mogu da izazovu i gastrointestinalne tegobe, ukoliko je virus ušao u organizam oralnim putem preko kontaminirane hrane i vode. Infekcija obično počinje blagim respiratornim simptomima, praćenim često febrilnim stanjem sa digestivnim tegobama, da bi, nakon širenja virusa u organizmu, nastali simptomi osnovne bolesti, što je u skladu sa tropizmom virusa (simptomi meningitisa, miokarditisa, herpangine, osipnih bolesti, pa i dečije paralize kod nevakcinisanih...). Enterovirusi su mali virusi, veličine 24-30 nm, ikozaedarne simetrije, sa jednolančanim RNK genomom u vidu pozitivnog lanca (26,28).

U poslednje vreme postoje navodi da **ptičiji virus influence A H₅N₁**, iz porodice *Orthomyxoviridae*, može da izazove i gastrointestinalne tegobe. Virus je izolovan iz pilećeg mesa i jaja u pojedinim slučajevima gastroenterokolitisa, ali u potpunosti nije dokazana transmisija virusa unošenjem kontaminirane hrane (26,28).

Slični podaci postoje i za **SARS Coronavirus**, koji spada u viruse izazivače pre svega respiratornih simptoma. Međutim, u epidemiji, nastaloj u stambenom kompleksu u Hong Kongu, virus je dokazan kod većeg broja obolelih, koji su imali gastrointestinalne tegobe, pa se zato prenošenje virusa oralnim putem ne može isključiti (26,28).

Nipah virus, čiji je prirodni domaćin slepi miš, koji se hrani voćem, opisan je kao uzročnik teških oboljenja kod ljudi i životinja. Dokumentovane epidemije u Maleziji i Bangladešu, uzrokovane ovim virusom, nastale su unošenjem kontaminirane hrane. Pošto nema puno podataka o načinu prenošenja ovog primarno životinjskog virusa, potrebna su dodatna ispitivanja (26).

Poslednjih godina nekoliko novih virusa je otkriveno u uzorcima stolice osoba sa dijarejom. To su **Saffold virus** (otkriven 2008.), **Cosavirus** (otkriven 2008.) i **Klassevirus/salivirus** (otkriven 2009.) iz porodice *Picornaviridae*, zatim **Bufavirus** (otkriven 2012.) i **Tusavirus** (otkriven 2014.) iz porodice *Parvoviridae*, kao i **Recovirus** novi član porodice *Caliciviridae* otkriven u uzorcima stolice u Bangladešu. Zbog malog broja istraživanja, koja su se bavila ovim virusima i nedovoljno dokaza koji povezuju ove viruse sa nastankom dijarealnog sindroma, značaj ovih virusa kao uzročnika gastroenterokolitisa je nejasan (12).

Sve ovo su bile samo činjenice i napomene, koje bitno ne utiču na diferencijalnu dijagnozu uzročnika akutnog virusnog gastrointestinalnog sindroma, bar u našoj sredini, gde su najčešći uzročnici rota, noro, astro ili enterični adenovirusi. Dijagnoza se najpreciznije i najbrže postavlja molekularnom dijagnostikom (*RT-PCR* testom za RNK viruse i *PCR* testom za DNK viruse).

3.0. Postupci i mere pri sporadičnom i epidemijском javljanju bolesti

3.1. Prevencija nastanka virusnog gastrointestinalnog sindroma prema preporukama SZO

Na osnovu svega navedenog, jasno je da su virusni gastroenterokolitisi u celom svetu u porastu. Svetska zdravstvena organizacija, kao osnov prevencije, preporučuje nekoliko ključnih stvari za bezbedniju ishranu:

1. Održavanje higijene (pranje ruku, pranje i dezinfekcija pribora za rad, radnih površina, održavanje čistoće prostorija u kojima se radi i eliminacija insekata i raznih životinja iz ovih prostorija)
2. Odvajanje svežeg od kuvanog (sveže meso, živina i morski plodovi mogu da sadrže opasne mikroorganizme, koji se mogu preneti na druge namirnice tokom pripremanja i čuvanja)
3. Temeljno kuvanje (pravilno kuvanje uništava gotovo sve opasne mikroorganizme, posebno temperatura iznad 70⁰C)
4. Čuvanje hrane uz poštovanje higijenskih standarda (u čistim, zatvorenim posudama i u frižiderima)
5. Korišćenje ispravne vode i svežih namirnica, kojima nije istekao rok, dobro pranje voća i povrća, pogotovo ako se jede sveže
6. Zaštita polja na kojima se gaji voće i povrće od kontaminacije životinjskim izmetom
7. Upotreba obrađenog otpada za đubrenje zemljišta
8. Voditi računa da se za navodnjavanje koristi bezbedna voda, bez moguće kontaminacije
9. Održavanje opreme za berbu i skladištenje na čistom i suvom (27).

Istovremeno, primenjuju se mere za sprečavanje prenošenja patogena na druge osobe. To su pre svega higijensko-preventivne mere, kao što su pranje ruku, posebno pre jela i posle direktnog kontakta sa obolelim ili sa predmetima obolelih, zatim, izbegavanje direktnog kontakta sa inficiranim osobama, izbegavanje konzumiranja termički neobrađene hrane, konzumiranje samo ispravne vode ili pasterizovanih tečnosti, posebno mleka, sprovođenje strogih higijenskih mera pri konzumiranju i hrane i vode na putovanjima. Bitno je da se osobe, koje su bile inficirane nekim od uzročnika dijarealnog sindroma, udalje sa posla još neko vreme nakon ozdravljenja, jer je dokazana

da se ovi virusi i više nedelja posle bolesti izlučuju u stolici (kliconoštvo). Ove osobe mogu da budu izvor infekcije i da dovedu do širenja bolesti, posebno ako učestvuju u pripremanju hrane i ne vode dovoljno računa o ličnoj higijeni (27).

Putnicima u visoko rizične regione preporučuje se uzimanje samo flaširene vode i izbegavanje konzumiranja rizične hrane. Visoko rizična hrana je svaka hrana koja je termički neobrađena (salata, voće, povrće), hrana koja dugo stoji na sobnoj temperaturi i sveža ili delimično kuvana riba i školjke (26,27).

Vakcina, kao metod prevencije nastanka bolesti, postoji samo za rotaviruse, dok za druge uzročnike virusnog gastroenterokolitisa vakcina još ne postoji. Primena vakcine protiv rotavirusa redukovala je u značajnoj meri incidencu rotavirusnih infekcija u pedijatrijskoj populaciji u SAD. U laboratorijama se radi i na mogućnosti proizvodnje vakcina protiv drugih uzročnika dijarealnog sindroma, mada ovo za sada ide teško. Naime, većina virusa uzročnika dijarealnog sindroma (osim rotavirusa), ne mogu se umnožavati u kulturama ćelija.

3.2. Dijagnostika

Dijagnostika virusnog gastrointestinalnog sindroma treba da bude sprovedena što brže i to korišćenjem najpreciznijih dijagnostičkih tehnika – pre svega upotrebom molekularne dijagnostike *PCR* tehnikom. Za postavljanje dijagnoze potrebno je analizirati simptome bolesti, nalaze fizičkog pregleda obolelog, podatke o korišćenoj hrani, kontaktu sa obolelim osobama, ukoliko ih ima, kao i podatke o eventualnim putovanjima u zemlje sa manjim higijenskim standardima. Prvo je potrebno da se isključi bakterijska infekcija, kao i infekcije drugim mikroorganizmima, a istovremno se rade testovi virusološke dijagnostike.

Virusološka dijagnostika obuhvata: vizuelizaciju virusa pomoću elektronskog mikroskopa i identifikaciju pomoću imunoelektronske mikroskopije, kao i detekciju virusnih antigena i virusnih nukleinskih kiselina (virusnog genoma). Kultivisanje ovih virusa je pokušavano, ali je bilo neuspešno. Zahtevalo je izbor selektivnih tkivnih kultura, ali bez uspeha. Zato se ovi virusi ne mogu kultivisati, osim rotavirusa. Serološka dijagnostika (dokazivanje antivirusnih antitela) nije značajna za postavljanje dijagnoze bolesti (78,97,129,130).

1. **Elektronska mikroskopija** nije u širokoj upotrebi za virusološku dijagnostiku akutnog gastrointestinalnog sindroma. Primenjuje se u posebnim laboratorijama, koje su dobro opremljene i imaju edukovan kadar za ovu dijagnostiku. Elektronski mikroskop, umesto svetlosnih zraka, koristi snop elektrona, a umesto staklenih sočiva, elektromagnetna polja. Ovaj mikroskop daje uvećanje preko 100 000 puta (savremeni transmisivni elektronski mikroskopi uvećavaju i 400000 puta). Uzorak je najčešće stolica. Pripreme su kratkotrajne i obično se koristi negativno bojenje.

Za uspešno dokazivanje virusa elektronskim mikroskopom, virus u uzorku mora biti zastupljen u koncentraciji od 10^6 ili više u 1 ml uzorka. Mora se voditi računa da se tačno prepozna virusna morfologija i da se virusi razlikuju od artefakata, detritusa i delova ćelije domaćina, zbog čega je potreban obučeni kadar. Glavna prednost ove metode je mogućnost da se virus direktno vidi i da se utvrdi njegova karakteristična morfologija. Isto tako, istovremeno se u preparatu može otkriti veći broj raznih virusnih uzročnika, ukoliko su prisutni u uzorku. Ovom tehnikom virus se identifikuje samo do nivoa porodice, ali se ne može napraviti razlika između pojedinih pripadnika iste morfološke grupe. Takođe, pošto se radi sa relativno malim količinama uzoraka, postoji mogućnost da se prisutan virus ne dokaže. Zbog svega navedenog, pregled elektronskim mikroskopom, koji je vrlo skup, ne koristi se u rutinskoj virusološkoj dijagnostici (129-132).

2. **Imunoelektronska mikroskopija** je osetljivija metoda od elektronske mikroskopije i omogućava potpunu identifikaciju virusa u uzorku. Zasniva se na mešanju uzorka sa određenim virusnim antitelima, pri čemu se elektronskim mikroskopom traži imunološka reakcija između dodatih antitela i virusa prisutnog u uzorku. Koriste se poznati monospecifični antiserumi visokog titra antitela (monoklonalna antitela). Pošto je uzorak moguće testirati sa samo nekoliko odgovarajućih antiseruma, uvek se mora imati pretpostavka o kom virusu se radi. Zato se ova metoda ne može primeniti na viruse sa mnogo specifičnih serotipova, koji nemaju zajedničke antigene (npr. enterovirusi). Imunoelektronska mikroskopija se koristi i u dijagnostici virusa, koji se ne mogu umnožavati u kulturi ćelija. Međutim, interpretacija dobijenih rezultata zahteva iskustvo i razlikovanje spontane agregacije virusa u uzorku od agregacije usled vezivanja sa antitelima (129,130).
3. **Za detekciju virusnih antigena**, u cilju direktne dijagnostike, koriste se brojni komercijalni testovi (imunohromatografski testovi, aglutinacija, ELISA testovi). Ovi testovi se u rutinskoj dijagnostici najčešće primenjuju za brzo postavljanje dijagnoze. Nedostatak im je što se njima ne može otkriti virus kada se nalazi u manjoj količini u uzorku, a ne može ni grupa ni tip virusa, što je nekad potrebno u epidemiološke svrhe. Dobar deo ovih testova pripada brzim testovima, što je posebno prihvatljivo za rutinsku dijagnostiku, bez obzira na različitu, ali pre svega manju specifičnost i senzitivnost ovih testova (12,129).
4. **Molekularne metode**, kojima se utvrđuje nukleinska kiselina virusa u uzorku, imaju visoku senzitivnost i specifičnost, ali zahtevaju skupu aparaturu i iskusno i obučeno osoblje. Reakcija lančane polimerizacije (*PCR* test) je metoda koja amplifikuje prisutnu nukleinsku kiselinu i tako omogućava detekciju virusa u uzorku, čak i kad se nalazi u minimalnim količinama. Za dokazivanje rota, noro, astro i enteričnih adenovirusa ovo je metoda izbora i ponekad jedini način

kojim je moguće brzo postaviti etiološku dijagnozu. Molekularne metode sve više postaju ključne metode u dijagnostici (77,97,129).

Analiza uzorka *PCR* testom odvija se u tri faze: faza ekstrakcije - izolacije virusne nukleinske kiseline iz uzorka, zatim, faza amplifikacije ciljne nukleinske sekvence (*PCR* u užem smislu) i faza detekcije umnožene ciljne sekvence. Za RNK viruse faza amplifikacije (*PCR* u užem smislu) započinje procesom reverzne transkripcije (reverzna transkripcija *PCR* test – *RT-PCR* test), pošto RNK ne može da se koristi kao matrica za *PCR*, jer *Taq* polimeraza kao matricu koristi isključivo jednolančani molekul DNK. Zbog toga, tokom reverzne transkripcije prepisuju se virusna RNK u komplementarnu DNK, koja zatim služi kao matrica za amplifikaciju u *PCR* reakciji. Nakon reverzne transkripcije, amplifikacija se odigrava u ciklusima, a svaki ciklus se sastoji iz tri faze: denaturacija, hibridizacija i elongacija. Jedan ciklus traje nekoliko sekundi ili nekoliko minuta (zavisno od modifikacije osnovnog testa), a broj DNK lanaca udvostručuje se posle svakog ciklusa. Obično se ciklus ponavlja 25 do 45 puta. Očitavanje rezultata kod *PCR* testa se može izvoditi u kombinaciji sa gel elektorforezom (umnožena ciljna sekvenca se identifikuje na osnovu svoje veličine), hibridizacijom sa obeleženim probama, ili merenjem fluorescencije u realnom vremenu. U detekciji amplifikona kod običnog *PCR* testa, *PCR* produkti se prvo prenose na agarozni gel i podvrgavaju elektroforezi. Pošto su negativno naelektrisani, DNK fragmenti se kreću od negativne ka pozitivnoj elektrodi. Razdvojeni fragmenti boje se etidijum-bromidom, koji fluorescira kada je vezan za DNK i posmatraju se pod UV svetlom. Kvalitativna detekcija ciljnog DNK fragmenta poznate dužine vrši se poređenjem sa standardom (engl. *ladder* - “merdevine”), koji predstavlja mešavinu DNK fragmenata različitih dužina (64,131,132).

Kvantitativna *PCR* metoda (*qPCR* - engl. *Quantitative polymerase chain reaction*) primenjuje se u cilju kvantifikacije virusnih čestica u uzorku, što igra značajnu ulogu u proceni terapijskog efekta i prognoze ishoda bolesti (131).

U novije vreme razvijene su i tehnike *PCR* za detekciju velikog broja uzročnika odjednom, sa uključivanjem više od jednog prajmera, što omogućava otkrivanje više ciljnih genoma (engl. *Multiplex PCR*). Tako postoje komercionalni testovi, kojima se istovremeno može ispitivati prisustvo različitih uzročnika gastroenteritisa (virusnih, bakterijskih, parazitarnih) (64).

Kod rotavirusa može se raditi i genotipizacija gena za VP4 (P genotip) i gena za VP7 (G genotip) uz pomoć *RT-PCR*, koristeći virusnu RNK, izolovanu iz uzoraka stolice. P-genotipizacija se izvodi tako da se u prvom koraku odvija *PCR* reakcija, u kojoj se amplifikuje ceo gen za VP4 protein. U drugom koraku *PCR* reakcija je multipleks i u njoj su uključeni prajmeri komplementarni promenljivim (varijabilnim) regionima u genu za VP4, koji su veoma različiti po dužini sekvence i redosledu nukleotida između različitih P tipova na osnovu čega se i vrši njihova diferencijacija

(P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], i P[11]). Slično tome, G-genotipizacija se izvodi tako da se u prvoj PCR reakciji amplifikuje ceo gen za VP7 protein. Druga reakcija je multipleks PCR reakcija, koja uključuje prajmere komplementarne sa 5' varijabilnim regionom u VP7 genu, koji je veoma različit po dužini sekvence i redosledu nukleotida između različitih G tipova (G1, G2, G3, G4 i G9). *RT-PCR* test rotavirusnih gena VP4 i VP7 omogućava određivanje rotavirusnog genotipa pomoću direktne vizuelizacije dobijenih amplikona različite veličine, specifičnih za različite genotipove, elektroforezom na agaroznom gelu (64).

Real-time PCR ili PCR u realnom vremenu je metoda, koja kombinuje konvencijalnu PCR amplifikaciju i fluorimetriju. Upotrebom fluorescentne boje (*SYBR Green* metoda) ili fluorescentno obeleženih proba (*Taq-Man* metoda) moguće je odrediti količinu PCR produkata u realnom vremenu, odnosno, nakon svakog pojedinačnog ciklusa PCR reakcije. Specifično umnožavanje DNK sekvence se vrši PCR testom na uobičajeni način, ali se posle svakog ciklusa umnožavanja vrši i vizualizacija DNK. Intenzitet fluorescencije je proporcionalan količini amplikona. *Taq-Man* metoda se zasniva na upotrebi obeleženih DNK proba (sa *Reporter* i *Quencher* fluorescentnim bojama, vezanim za krajeve probe), koje hibridizuju sa ciljnom DNK. Nakon toga, *Taq* polimeraza sintetiše komplementaran lanac počevši od prajmera uklanjajući vezanu *Taq-Man* probu, koja joj se nađe na putu. *Quencher* ima osobinu da smanjuje fluorescenciju koju emituje *Reporter* dok god se nalazi u njegovoj neposrednoj blizini, što je slučaj kada je proba intaktna. Pošto prilikom amplifikacije, dolazi do odvajanja *Reporter* i *Quencher* boja, *Reporter* emituje fluorescenciju, koja se zatim kvantifikuje. Detekcija se zasniva na određivanju trenutka u kojem se umnožavanje željene sekvence detektuje prvi put. Što je veća količina ciljne sekvence u uzorku to će pre doći do njenog vidljivog umnožavanja. Parametar Ct (engl. *Threshold cycle*) je ciklus u kojem dolazi do povećanja fluorescencije iznad zadatog praga detekcije. Ovo povećanje fluorescencije potiče od eksponencijalne faze umnožavanja PCR produkata. Određivanje broja kopija ciljne DNK u nepoznatim uzorcima (kvantifikacija), postiže se merenjem Ct vrednosti i njenim poređenjem sa Ct vrednosti standarda, čiji je broj kopija poznat. Pošto se metoda izvodi u zatvorenom sistemu, sprečava se kontaminacija tokom izvođenja reakcije (131).

Analiza dobijenih sekvenci je konačna metoda za potvrđivanje detekcije virusa i za karakterizaciju genotipova, koji su dobijeni *RT-PCR* testom (za RNK viruse) i *PCR* testom (za DNK viruse). PCR produkti određenih gena virusa, dobijeni na agaroznom gelu, prvo se prečišćavaju, a zatim se vrši njihovo sekvenciranje. Sekvenciranje je određivanje redosleda nukleotida u sastavu ispitivanog dela lanca nukleinske kiseline. Za izvođenje metode sekvenciranja koristi se DNK matrica, enzim DNK polimeraza i dezoksinukleotidi (dNTP) kao gradivne jedinice za novi lanac. Metoda sekvenciranja podrazumeva korišćenje samo jednog para prajmera. Tako se u

svakoj reakciji očitava po jedan lanac iz dvolančanog DNK molekula. To znači da se broj kopija linearno povećava i da je potrebna znatna količina početnog genoma da bi reakcija uspela. Za očitavanje sekvence neophodno je kapilarno elektroforetsko razdvajanje smeše oligonukleotida, koji su proizvod reakcije sekvenciranja. Danas se koristi automatsko sekvenciranje sa fluorescentnim bojama, koje se detektuju kamerom u toku elektroforeze. Tako dobijeni podaci o prisustvu i vrsti fluorescencije se kompjuterski obrađuju u grafički prikaz sekvence – elektroferogram. U elektroferogramu svaki vrh predstavlja jedan nukleotid. Primenom ove metode moguće je u genomu virusa odrediti redosled do 500 baza, pa i više. Od devedesetih godina prošlog veka, najčešće korišćeni metod automatizovanog sekvenciranja DNK-a je sekvenciranje metodom po Sangeru. Sangerov metod naziva se još i dideoksi sekvencioniranje, jer se bazira na prisustvu dideoksinukleotid trifosfata (ddNTP). Dideoksinukleotid trifosfati se od običnih deoksinukleotid trifosfata razlikuju po nedostatku 3' hidroksilne grupe. Svaki od ovih ddNTP-a je obeležen drugom fluorescentnom bojom, sa različitim talasnim dužinama emitovane svetlosti prilikom eksitacije. Dideoksinukleotidi nemaju 3' hidroksilnu grupu i mogu se ugraditi u rastući DNK lanac, vezivanjem svoje 5' trifosfatne grupe za slobodnu 3' hidroksilnu grupu poslednjeg nukleotida u lancu. Odsustvo 3' hidroksilne grupe na ddNTP-u onemogućava formiranje fosfodiesterske veze sa sledećim nukleotidom, tako da dolazi do terminacije sinteze DNK. Ovo ima za posledicu stvaranje velikog broja lanaca DNK različite dužine. Metoda se izvodi u četiri različite tube, od kojih svaka sadrži odgovarajuću količinu jednog od četiri terminatora (A, T, G, C). Proizvodi reakcije sekvenciranja se zatim podvrgavaju elektroforezi u automatskom genetskom analizatoru (sekvencioneru). Lanci DNK se kreću u specijalnom polimeru pod dejstvom struje. Tako se kroz tanku kapilaru, koja prolazi pored laserskog čitača, kraći lanci kreću brže od dugih lanaca. Laserski čitač detektuje intezitet fluorescencije koju emituju dideoksinukleotidi, smešteni na kraju lanca. Kada svi lanci DNK prođu kroz kapilaru i detektor očita sve obeležene dideoksinukleotide, kompjuterski program aparata vrši upoređivanje i obradu podataka, uz izradu hromatograma, na osnovu koga se određuje redosled u sekvenci. Na hromatogramu se nalaze različito obojeni pikovi. Svaki pik predstavlja odgovarajući nukleotid na određenom mestu u sekvenci. Kada se dobiju konsenzus sekvence sekvenciranih gena, one se upoređuju sa postojećim sekvencama, dostupnim u GenBank bazi podataka (NCBI - *National Center for Biotechnology Information, Nacional Institutes*) (64,133-135).

U specijalizovanim i ekspertskim laboratorijama može se uraditi **molekularna analiza genoma dokazanih virusa (sekvenciranje)**, tako da se odgovarajućim prajmerima i aparatom sekvencerom može utvrditi mesto ovih uzročnika u filogenetskom stablu, kao i eventualne promene u njihovom genomu (77,97,129). Za filogenetsku analizu izolata različitih vrsta virusa neophodno je

poznavanje sekvenci virusnih genoma. Filogenetskom analizom mogu da se utvrde genetske sličnosti ili razlike između pojedinih virusnih gena ili delova njihovog genoma. To se potiče međusobnim poređenjem sličnih sekvenci. Sve analizirane sekvence treba poredati tako da se istovetni najbliži delovi genoma nalaze jedni naspram drugih, što se naziva poravnavanje ispitivanih sekvenci. Filogenetsko stablo je grafički prikaz evolucionih odnosa između organizama. Njega sačinjavaju čvorovi, povezani granama, koje polaze iz istog korena. Način grananja filogenetskog stabla u celini, označava se kao njegova topologija (64,133-135).

5. **Serološka dijagnostika dokazivanjem specifičnih antitela** nije značajna za postavljanje dijagnoze, nego se samo može koristiti za ispitivanje imuniteta (potvrdu efikasnosti vakcine) i za epidemiološko praćenje (129).

3.3. Terapija

Bolesnicima sa virusnim gastrointestinalnim sindromom daje se simptomatska terapija. Najznačajniji korak u terapiji pacijenata je rehidracija. Smanjen volumen tečnosti i disbalans elektrolita su glavni uzroci morbiditeta i mortaliteta kod osoba sa akutnim dijarealnim sindromom, izazvanim virusima. Bolesnici gube elektrolite u dijarealnoj stolici, a rehidracija se može postići nadoknadom tečnosti, odnosno, primenom rastvora za rehidraciju, koji sadrže glukozu i soli. Kod većine bolesnika terapija se može sprovesti oralnim putem, dok se kod bolesnika sa ispoljenim teškim simptomima dehidracije primenjuju intravenske infuzije izotoničnih rastvora (npr. 0.9% fiziološki rastvor, 5% glukoza u 0.9% fiziološkom rastvoru ili Ringerovom rastvoru). Rehidracija i nadoknada elektrolita najznačajnije je da se brzo primene kod male dece.

Pored ovih terapijskih postupaka, istovremeno se vrši i odgovarajuća korekcija ishrane, naprimer u skladu sa nepodnošenjem laktoze, koja prati akutnu rotavirusnu bolest. Poslednjih godina velika pažnja je usmerena na praćenje efekata primene laktobacila (*Lactobacillus*), kao terapijskog agensa u akutnoj virusnoj dijareji. Zapaženo je da laktobacilus poboljšava apsorpciju natrijuma, hidrataciju i tako ubrzava oporavak bolesnika. Oralna primena *Lactobacillus acidophilus* BG2F04 dovodi i do stanja podnošenja laktoze kod obolelih.

Akutni dijarealni sindrom se može definisati kao pojava više od tri tečne ili vodenaste stolice u toku 24 sata, pri čemu je još važniji sastav, a ne broj stolica. U lečenju je najznačajnije da se odmah primene sve mere simptomatske terapije. Na prvom mestu to je odgovarajuća rehidracija, jer je jedan od najvećih problema, posebno kod male dece, gubitak vode i elektrolita. Bitno je da se utvrdi stepen dehidracije (blaga, umerena ili teška). Naime, uglavnom usled dehidracije, svake godine u svetu od diaree umre više od 3 miliona dece mlađe od 5 godina (136-138).

Dijarealni sindrom se češće i u težem obliku javlja kod dece u prve dve godine života, pri čemu je incidenca dijareje najveća u uzrastu 6 do 11 meseci. Naime, u tom uzrastu dece uvodi se dopunska hrana, odojčice počinje da puze i dodiruje predmete oko sebe, a nivo antitela dobijenih od majke je potpuno snižen ili ne postoji. Zato je u ovim slučajevima najznačajnije brzo i adekvatno reagovanje, pre svega rehidracija.

Pre pristupanja kompletnom terapijskom postupku, posebno kod odraslih, potrebno je isključiti činjenicu da je dijareja mogla nastati zbog određenih lekova, toksina, alergije, hemioterapije, radioterapije, značajno smanjenog unosa hrane kod posta itd., pošto takav dijarealni sindrom nije kontagiozan. Kontagiozni dijarealni sindrom je izazvan infektivnim uzročnicima proliva: bakterijama, parazitima i virusima. Od bakterijskih uzročnika to su najčešće: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, a od parazitaranih uzročnika *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*. Isto tako, *Escherichia coli* i *Vibrio colere* mogu da dodatno produkuju toksine, koji oštećuju epitel creva i tako dovode do pojačane sekrecije vode i elektrolita. Zato je potrebno da se, u cilju primene svih odgovarajućih mera, isključe bakterijski i parazitarani uzročnici dijarealnog sindroma, kao i da se brzim i efikasnim dijagnostičkim metodama dokaže virusni uzročnik bolesti. Za dijagnostiku virusa danas se kao najbolji smatraju molekularni testovi. Brzo terapijsko reagovanje je posebno važno, pošto simptomi nastanu naglo, manifestuju se učestalim vodenastim stolicama, obično bez vidljivih tragova krvi, uz moguće prisustvo sluzi. Bolest je praćena mukom, povraćanjem (posebno kod infekcije norovirusom), uz prisutan abdominalni bol i obično povišenu temperaturu. Potrebno je da se što pre izvrši dijagnostika, da bi se što ranije, odnosno, praktično odmah, uvele terapijske mere. Pošto su virusi, uzročnici dijarealnog sindroma, lokalizovani u proksimalnom delu tankog creva, oni oštećuju crevne resice (vili). Zbog toga, dolazi do pojačane sekrecije i do gubitka digestivnih i apsorbiranih funkcija. Zbog svih ovih razloga osnovni terapijski postupak je rehidracija (nadoknada vode i elektrolita). Pored toga, mora se preporučiti istovremena primena pravilne ishrane za vreme dijareje i tačno navesti njen sastav, uz dodatnu pravilnu hidrataciju. Neophodno je nastaviti adekvatnu ishranu posle prestanka proliva. Bitno je da se ima u vidu mogući nedostatak vitamina A, poremećaj metabolizma elektrolita, kao i mogući nastanak konvulzija kod najtežih slučajeva obolelih. Isto tako, važno je znati da je kod pothranjene dece dijareja mnogo teža, duže traje, tako da je i rizik od smrtnog ishoda veći, ukoliko se brzo ne reaguje terapijski. Uz rehidraciju i druge potrebne terapijske postupke, zavisno od slučaja, dete mora dobiti preporučenu redovnu ishranu. To je dojenje, ako dete sisa, a ako ima 6 i više meseci i već uzima kašastu hranu, pored mleka, treba davati i žitarice, određeno povrće, pa i proteine, zatim hranu koja sadrži kalijum, kao što su sokovi od svežeg voća. Treba izbegavati hranu, koja sadrži veće količine šećera, jer može da pogorša proliv. Da bi se moglo proceniti koliki je stepen

dehidracije kod deteta, mora se dobro oceniti njegovo opšte stanje, izmeriti telesna masa u odnosu na prethodnu, koja je poslednja zabeležena, izmeriti temperaturu, puls, turgor kože, disanje, postojanje žeđi. Zatim, kod sasvim male dece, procenjuje se izgled očiju, usta i jezika, kao i stanje fontanele. Sve ovo će opredeliti terapijske mere, rehidraciju (da li će biti oralna ili intravenska, odnosno, kombinovana), preporučeni režim ishrane, kao i razmatranje potrebe bolničkog lečenja (136-140).

3.4. Sporadično i epidemijsko javljanje virusnog dijarealnog sindroma

Već dugo vremena u svetu je poznato da su virusni gastroenteritisi jedna od najčešćih akutnih infektivnih bolesti u svim regionima. Javljaju se kod osoba svih starosnih grupa, a često i u dečijem uzrastu. Najčešći uzročnici su rotavirusi, norovirusi, pa i astrovirusi i enterični adenovirusi. Njihova zajednička osobina je da su veoma infektivni (za infekciju su dovoljne male količine virusa) i vrlo su otporni na različite fizičke i hemijske faktore, tako da relativno dugo mogu da ostanu u spoljnoj sredini. Činjenica je da u pripremljenoj hrani mogu da ostanu prilično dugo, bez vidljivih promena (mirisa, ukusa i izgleda ove hrane), pošto se virusi razmnožavaju samo u živim ćelijama, prema kojima imaju tropizam i jedino se tako umnožavaju. Zato je u hrani teško primetiti njihovo prisustvo. Navedeni virusi su česti uzročnici intrahospitalnih epidemija, epidemija u dečijim kolektivima (vrtićima), školama, u staračkim domovima, na turističkim putovanjima, u hotelima i internatima. Tako tamo nastanu i zatim se šire epidemije. Preko pojedinih inficiranih osoba, bolest se može preneti i na porodicu, što takođe može da dovede do manjih epidemija. Bolesnici kod kojih su simptomi relativno blagi, još češće prenose i šire infekciju. To važi i za osobe koje nemaju tegobe, a neko vreme izlučuju virus u stolici (26-29).

Pošto bolest kod svih pomenutih virusnih uzročnika nastaje naglo, potrebno je brzo i adekvatno reagovanje zdravstvene službe, kako bi se odmah izvršila rehidracija (nadoknada vode i elektrolita, uz ostale neophodne mere kod svakog obolelog). Isto tako, bitno je da se odmah pristupi protivepidemijskim postupcima i merama epidemiološke službe, kako bi se sprečio nastavak epidemije i širenje nastale epidemije. Za sve ove mere i postupke neophodna je brzo i tačno izvršena laboratorijska dijagnostika i dokazivanje uzročnika nastalog dijarealnog sindroma.

Laboratorijska dijagnostika virusnog gastroenterokolitisa još uvek se najčešće vršila dokazivanjem virusnih antigena u uzorcima stolice enzimskim imunotestovima i metodom aglutinacije, jer sve laboratorije nemaju uslove za dijagnostiku elektronskom mikroskopijom, imunoelektronskom mikroskopijom, ili molekularnim testom *real-time PCR* metodom, koja se odlikuje najvećom osetljivošću i specifičnošću. Danas se navodi da je *real-time PCR* test najbolja

metoda u dijagnostici virusnog gastrointestinalnog sindroma. Naime, *real-time PCR* test omogućava brzo dobijanje dijagnostičkih rezultata, što je neophodno kod virusnog dijarealnog sindroma, da bi se odmah preduzele odgovarajuće mere prema obolelima i postupci u cilju sprečavanja epidemijskog širenja bolesti. Pored toga, *real-time PCR* test omogućava identifikaciju virusa u uzorku stolice, čak i ako u poslatom uzorku ima mali broj virusnih čestica, što se može desiti kod osoba koje su u kontinuitetu imale veliki broj tečnih stolica jednu za drugom. Sve ovo su nesumnjive dijagnostičke prednosti *real-time PCR* testa. Dijagnostički serološki testovi za dokazivanje virusnih antigena u uzorcima stolice, odnosno, takozvani „brzi testovi“ daleko su manje osetljivi. Pomenuti testovi često daju negativan nalaz, iako se radi o virusnoj dijarealnoj bolesti. Naime, rezultat ovih „brzih testova“ u mnogome zavisi od uzorka (da li je uzorak uzet u prvih 48 sati, kako je uzet, kako je transportovan do laboratorije, kako je čuvan pre laboratorijskog rada). Testovi za dokazivanje antivirusnih antitela nemaju dijagnostički značaj kod ovog oboljenja (129).

Pošto u prvobitnom odnosno ranijem dijagnostičkom radu nije korišćen, ili nije redovno korišćen *real-time PCR* test, često je zaključak o bolesti postavljan tako, što je izvršena bakteriološka dijagnostika na uzorku, a pregled na bakterije je bio negativan. Tada je indirektno zaključeno da se radi o virusnom uzročniku dijarealnog sindroma. Kao argument za ovakav zaključak navođeno je i da su kliničke manifestacije bile karakteristične. To, međutim, ne može biti presudan pokazatelj za dijagnostički zaključak, čak ni kada se dodaju epidemiološki podaci, mada su ovi podaci od većeg značaja. Tako su često virusni gastroenterokolitisi prikazivani isključivanjem postojanja bakterijskih uzročnika iz uzoraka stolice i analizom kliničkih, pa i epidemioloških podataka, što nije siguran pokazatelj uzroka bolesti. Pogotovo, ako se prema sada važećim propisima virusni gastroenterokolitisi prijavljuju kao posebna dijagnoza precizno navedena, naročito kada se jave epidemijski. Zato je neophodno da se u redovni dijagnostički rad uvede kao trenutno najbolji test *real-time PCR*. Tako se može tačno sagledati i utvrditi značaj i uloga virusnih gastroenterokolitisa u zdravstvenoj patologiji Vojvodine.

Mora se imati u vidu da su rotavirusi među glavnim uzročnicima morbiditeta kod dece, posebno kod odojčadi i male dece do 5 godina, gde su moguće komplikacije bolesti, pa i smrtni ishod, ukoliko se brzo ne postavi tačna dijagnoza i ne primeni adekvatna terapija (pre svega rehidracija – nadoknada vode i elektrolita). No, i rotavirusi, kao i norovirusi, javljaju se isto tako u svim starosnim grupama obolelih od dijarealnog sindroma. Norovirus je nešto češći kod starijih, odnosno, kod odraslih osoba, ali se javlja i kod dece. Podaci pokazuju da norovirusi najčešće dovode do epidemija, koje su česte i u staračkim domovima. Brza i tačna dijagnostika je značajna, pošto stare osobe mogu često imati komplikacije, pa i smrtni ishod bolesti, ukoliko se brzo ne

pristupi odgovarajućem tretmanu, što je moguće nakon postavljene tačne dijagnoze *real-time RT-PCR* ili *real-time PCR* testom. Epidemije su povezane najčešće sa upotrebom kontaminirane hrane, a infekcija se prenosi i kontaminiranom vodom, kontaktom sa inficiranom osobom, ili sa kontaminiranim predmetima i površinama. Astrovirusne infekcije se nešto ređe javljaju i najčešće izazivaju dijarealni sindrom kod dece. Enterični adenovirusi, isto tako, češće izazivaju infekcije kod dece, ali su dokazani i kod obolelih odraslih osoba. Izazivaju obično nešto blažu kliničku sliku kod obolelih, pa se oni često ne javljaju lekaru. To je loše, jer može da pogoduje širenju epidemije u kolektivu ili porodici (1-3).

U periodu od 1997. do 2004. godine, virusni gastroenterokolitisi, u grupi crevnih zaraznih bolesti, prema važećim propisima, prijavljivani su na osnovu kliničke slike kod obolelih, najčešće bez virusološke potvrde etiološkog uzročnika. Jedino su obično bili isključeni bakterijski uzročnici. Tako, mada je na kraju ovog perioda u Vojvodini rasla incidenca prijavljenih gastroenterokolitisa, označenih kao virusni, ovi podaci nisu bili praćeni i registrovanjem i opisivanjem epidemija ovog oboljenja.

Od 2012. godine napravljen je plan da se uzorci stolice iz cele Vojvodine, kod sumnje na virusne gastroenterokolitise, kako kod sporadičnog, tako i kod epidemijskog javljanja ove bolesti, šalju Institutu za javno zdravlje Vojvodine Centru za virusologiju, gde je uvedena redovna dijagnostika *real-time PCR* testom. Isto tako, od avgusta 2012. godine Institut je započeo projektni zadatak, koji ima za cilj unapređenje epidemiološkog nadzora nad virusnim gastroenteritisima u Vojvodini.

U ovom naučnom istraživanju, u okviru doktorske disertacije, planirano je detaljno analiziranje virusnih gastroenterokolitisa, uz redovnu primenu molekularne dijagnostike (*real-time RT-PCR* ili *real-time PCR* testom). Planirano je i detaljno analiziranje virusnih genoma, da bi se utvrdila njihova eventualna promenljivost, odnosno, da bi se odredila filogenetska pripadnost. Ovo istraživanje treba da uvede redovnu molekularnu dijagnostiku kod sumnje na virusni dijarealni sindrom, kako kod sporadičnog, tako i kod epidemijskog javljanja bolesti. Zatim, da se izvrše sve molekularne, kliničke, epidemiološke analize i da se tako sagleda prava slika o značaju i učestalosti virusnog gastroenterokolitisa u Vojvodini. To bi poslužilo da se napravi tačan protokol rada, imajući u vidu incidenciju virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini. Omogućilo bi takođe da se postavi algoritam primene *real-time RT-PCR* testa (za RNK viruse) i *real-time PCR* testa (za DNK viruse) u redovnoj dijagnostici virusnog dijarealnog sindroma.

4.0. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi incidenciju virusnog gastrointestinalnog sindroma u vojvođanskoj populaciji primenom najsavremenijih molekularnih metoda, kao i učestalost sporadičnih slučajeva i epidemijskog javljanja ove bolesti.
2. Postaviti algoritam primene *real-time PCR* testa za dijagnostiku virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini.
3. Sekvenciranjem analizirati pozitivne uzorke stolice na molekularnom nivou u cilju potvrde specifičnosti *real-time PCR* testa i izvršiti genetsku tipizaciju i filogenetsku analizu virusnih izolata dokazanih u uzorcima obolelih.

Hipoteze istraživanja:

1. Incidencija virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini biće 30-40%, pri čemu će se ovaj sindrom javljati kod dece do 5 godina češće sporadično, dok će kod odraslih biti prisutno i epidemijsko javljanje.
2. Primenom *real-time PCR* testa za dokazivanje virusnih uzročnika dijarealnog sindroma moguće je problem sagledati u celini i postaviti algoritam njegove primene u Vojvodini.
3. Molekularnom analizom pozitivnih uzoraka stolice sekvenciranjem pokazaće se da su uzročnici rotavirusnih infekcija iz grupe A i to genotipovi G1P[8], G2P[4], G3P[8] i G4P[8]; uzročnici norovirusnih infekcija iz genogrupe II tip 4; uzročnici astrovirusnih infekcija pripadaće grupi klasičnih astrovirusa genotipu 1, a uzročnici adenovirusnih infekcija pripadaće grupi F, tipovima 40 i 41.

5.0. Materijal i metode

5.1. Materijal

5.1.1. Grupa za istraživanje

Istraživanje je sprovedeno u periodu od 2012. do kraja decembra 2016. godine na teritoriji Vojvodine. U petogodišnjem periodu ispitani su uzorci stolice 1003 osobe, starosti od nekoliko meseci do preko 90 godina, kod kojih je postavljena sumnja na akutni gastrointestinalni sindrom virusne etiologije. Uzorci stolice za analizu prikupljeni su preko uspostavljene saradnje sa bolnicama i domovima zdravlja, posebno sa Institutom za zaštitu zdravlja dece i omladine u Novom Sadu i Klinikom za infektivne bolesti Kliničkog centra Vojvodine, uz saradnju i pomoć epidemiologa Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Da bi u istraživanje bili uključeni oboleli od gastrointestinalnog sindroma iz cele Vojvodine, uspostavljena je saradnja i sa okružnim zavodima za javno zdravlje na teritoriji AP Vojvodine (Zavodom za javno zdravlje Sremska Mitrovica, Zavodom za javno zdravlje Pančevo, Zavodom za javno zdravlje Zrenjanin, Zavodom za javno zdravlje Kikinda, Zavodom za javno zdravlje Subotica i Zavodom za javno zdravlje Sombor). Ovo istraživanje je bilo uključeno u projektni zadatak Instituta za javno zdravlje Vojvodine pod naslovom „Unapređenje epidemiološkog nadzora na teritoriji AP Vojvodine“, koji je podrazumevao epidemiološki nadzor nad virusnim gastroenteritisima u Vojvodini. Deo ispitanika uzrasta do 5 godina bio je pregledan u okviru ispitivanja kompanije *Glaxo Smith Kline*. Svi ispitanici, uključeni u istraživanje, pošto su bili informisani, potpisali su pristanak i popunili anketni upitnik. Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije Instituta za javno zdravlje Vojvodine i Etičke komisije Medicinskog fakulteta, Univeziteta u Novom Sadu.

Uzorci stolice pacijenata svih starosnih grupa, kod kojih je postavljena sumnja na akutni gastrointestinalni sindrom, upućivani su u Centar za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Kriterijumi za uključivanje bolesnika u ovo istraživanje u okviru doktorske disertacije bili su podaci o trajanju bolesti manje od 10 dana, postojanju akutne dijarealne bolesti u vidu tečnih ili polutečnih stolica – najmanje 3 ili više dnevno, uz povraćanje i bolove u abdomenu. U ovo istraživanje nisu bili uključeni oni pacijenti koji ne ispunjavaju kriterijume, navedene kao klinički pokazatelji akutnog dijarealnog sindroma. Pacijenti koji su imali simptomatologiju, koja traje mesecima, pri čemu tegobe prođu, pa se opet ponavljaju više puta, a prisutni su i drugi simptomi, kao što je ispoljavanje kožnih manifestacija, dominantni respiratorni ili neki drugi simptomi..., nisu bili uključeni u ovo istraživanje.

Kriterijumi za uključivanje bolesnika u ovo istraživanje u okviru doktorske disertacije:

- Postojanje simptoma akutne dijarealne bolesti
- Simptomi ne traju duže od 10 dana
- Postojanje najmanje 3 ili više stolica dnevno (mogu biti praćene abdominalnim bolovima i povraćanjem)
- Stolice su tečne, polutečne, a ponekad i kašaste.

U istraživanje nisu bili uključeni bolesnici kada:

- Nema simptoma akutne dijarealne bolesti (kontrola zbog ranijih tegoba)
- Simptomi traju duže od 10 dana (dugotrajne tegobe)
- Postoje abdominalni bolovi sa opstipacijom, ili 1-2 stolice dnevno
- Postoje drugi simptomi (kožne manifestacije, respiratorni simptomi...) koji dominiraju, sa povremenim gastrointestinalnim tegobama
- Imaju dokazane parazitarne, gljivične i bakterijske infekcije
- Imaju dijagnostikovane hronične bolesti gastrointestinalnog trakta, praćene povremeno dijarealnim sindromom (ulcerozni kolitis, Kronova bolest...)
- Imaju stenoze creva zbog strikture creva, benigne i maligne tumore creva i okolnih organa creva
- Imaju dokazane bolesti praćene imunodeficijencijom (autoimune bolesti, *AIDS*...)
- Primaju dugotrajnu imunosupresivnu terapiju
- Primaju antibiotsku terapiju duži vremenski period (promena normalne crevne flore)
- Imaju dijagnostikovanu netoleranciju i alergiju na hranu (alimentarna alergija)
- Imaju dokazana endokrina oboljenja (hipertireoza, hipoparatiroidizam, *diabetes mellitus*, *Addison*-ova bolest).

5.1.2. Uzorak

Uzorci za ispitivanje molekularnim dijagnostičkim metodama bili su uzorci stolice osoba, kod kojih je postavljena sumnja na akutni gastrointestinalni sindrom virusne etiologije. Uzorci stolice uzimani su do 48 časova posle pojave simptoma bolesti. Sakupljano je 5 mililitara tečne ili 5 grama sveže stolice (veličine zrna graška) u posude za feces, koje su bile obeležene imenom i prezimenom pacijenata, kao i datumom uzorkovanja. Po uzimanju, uzorci stolice su odmah stavljeni na temperaturu 4⁰C (ručni frižideri sa patronama leda) i što pre su transportovani do laboratorije Centra za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine. Pristigli uzorci stolice su do obrade čuvani na temperaturi -76⁰C. Ponovljeno odmrzavanje i zamrzavanje uzoraka se izbegavalo.

5.1.3. Anketni upitnik

Anketni upitnik je ispunjavao lekar ili zdravstveni radnik, koji je pregledao obolelog i upućivao uzorke stolice na dijagnostičku analizu u Centar za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine pod sumnjom da se radi o virusnom gastroenterokolitisu. Pacijenti, lečeni ambulantno, samostalno su donosili uzorke stolice na analizu u Institut za javno zdravlje Vojvodine i u Centru za virusologiju su im popunjavani anketni upitnici. Anketni upitnik se sastojao iz sledećih podataka:

- Podataka o zdravstvenoj ustanovi i lekaru, koji je uputio obolelog, uz kontakt telefon i broj protokola
- Podataka o pacijentu (ime i prezime, datum rođenja, pol, adresa, kontakt telefon, zanimanje, kolektiv)
- Podataka o bolesti (datum javljanja tegoba, da li je bilo hospitalizacije, datum hospitalizacije, početak bolesti - naglo ili postepeno, prisutni simptomi –broj stolica dnevno, primese krvi i sluzi, muka i povraćanje, povišena temperatura, abdominalni bolovi i grčevi, glavobolja i bolovi u mišićima, preznojavanje, malaksalost, jeza, drhtavica, kolaps), kao i podataka o dužini trajanja bolesti
- Epidemioloških podataka (slična oboljenja u porodici, kolektivu ili naselju, datum uzimanja uzorka, radna dijagnoza pod kojom se pacijent upućuje) (Anketni upitnik u prilogu 1).

5.2. Metode

5.2.1. Metode lančane reakcije polimerizacije (PCR)

5.2.1.1. Priprema uzorka

Prvobitno je bilo potrebno obraditi uzorke stolice obolelih, da bi se mogli koristiti za molekularnu dijagnostiku. Od uzoraka stolice pravljena je 20% suspenzija u fiziološkom rastvoru. Nakon toga, ova suspenzija se vorteksovala i potom centrifugirala 5 minuta na 7000-12000 x g. Dobijeni supernatant se prenosio u novu mikrotubu i koristio kao uzorak za molekularnu dijagnostiku.

5.2.1.2. Izolacija nukleinskih kiselina

Protokol izolacije virusne RNK (za rota, noro i astrovirus) izvršen je prema originalnom uputstvu proizvođača kita za ekstrakciju *QIAamp Viral RNA Mini Kit*, *Qiagen inc., Valencia CA*,

USA. Protokol izolacije virusne DNK (za adenoviruse) izvršen je prema originalnom uputstvu proizvođača kita za ekstrakciju *Ribo virus, Sacace, Italy*. U cilju preveniranja kontaminacije, procedura ekstrakcije nukleinskih kiselina izvršena je u laminarnoj komori, uz korišćenje filtera sa aerosol barijerom i *PCR* sterilnih tubica. Uzorci su prvo lizirani pod visoko denaturišućim uslovima, koje obezbeđuje *Lysis* solucija. U primenjenim protokolima, nukleinske kiseline su se vezivale za membranu spin kolona. Potom se vršilo ispiranje vezanih nukleinskih kiselina radi uklanjanja inhibitora amplifikacije. Za eluciju nukleinskih kiselina korišćen je pufer za eluciju. Izolovane RNK i DNK na predhodno opisan način, čuvane su na -76°C i korišćene u daljim fazama istraživanja.

5.2.1.3. Identifikacija virusnih uzročnika *real-time RT-PCR* i *real-time PCR* testom

Identifikacija virusnih uzročnika izvršena je upotrebom komercijalnih kitova *Rotavirus/Norovirus/Astrovirus Real-TM* proizvođača *Sacace (Sacace Biotechnologies, Italy)* i *Adenovirus Elite MGB Kit* proizvođača *ELITech Group (ELITech Group Molecular Diagnostics, Italy)*. Ovim kitovima za *in vitro* dijagnostiku bila je moguća amplifikacija ciljane sekvence virusne nukleinske kiseline i kvalitativna detekcija virusnog uzročnika. Osetljivost testa za rotavirus je 1×10^3 kopija/ml, osetljivost za norovirus je 5×10^2 kopija/ml, osetljivost za astrovirus je 1×10^3 kopija/ml, a osetljivost za adenovirus je 10 kopija/20 μl .

Za RNK viruse *real-time RT-PCR* je započinjala procesom reverzne transkripcije (RT), pošto RNK ne može da se koristi kao matrica za *PCR*, jer *Taq* polimeraza kao matricu koristi isključivo jednolančani molekul DNK. Zbog toga, tokom reverzne transkripcije prepisivala se virusna RNK u komplementarnu DNK, koja je zatim služila kao matrica za amplifikaciju u *real-time PCR* reakciji.

Real-time RT-PCR je vršena u zapremini od 25 μl . Reakciona smeša, koja omogućava umnožavanje ciljane sekvence svakog od tri ispitivana virusa, dodavana je u zapremini od 15 μl . U sastav reakcione mešavine ulazile su sledeće komponente: *RT-PCR-mix-1 Rotavirus/Astrovirus (Norovirus/IC)*, *RT-PCR-mix-2*, *Hot Start Taq Polymerasa*, *RT-G-mix-2*, *M-MLV Revertase*. Ispitivani uzorak, kao i pozitivna i negativna kontrola dodavani su u zapremini od 10 μl . Reverzna transkripcija je izvođena pod sledećim uslovima: 30 minuta na 50°C , a zatim inaktivacija RNK polimeraze i aktivacija DNK polimeraze 15 minuta na 95°C . Proces amplifikacije se izvodio u 45 ciklusa, pod sledećim uslovima: 10 sekundi na 95°C , 35 sekundi na 60°C i 10 sekundi na 72°C . Amplifikacija i detekcija virusne RNK je vršena u aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Za adenovirus (koji je DNK virus) *real-time PCR* reakcija je vršena u zapremini od 40 μl , koju je činilo 20 μl reakcione smeše (ADV Q-PCR Mix) i 20 μl ispitivanog uzorka. U istoj količini

su dodavane i pozitivna i negativna kontrola. Proces amplifikacije se izvodio pod sledećim uslovima: 2 minuta na 50°C dekontaminacija, 2 minuta na 94°C početna denaturacija, a zatim 45 ciklusa od 10 sekundi na 94 °C, 30 sekundi na 60°C i 20 sekundi na 72°C. Amplifikacija i detekcija virusne DNK je vršena u aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

5.2.1.4. Određivanje genogrupe norovirusa i rotavirusa

Za detaljniju analizu identifikovanih virusnih uzročnika vršeno je određivanje genogrupe norovirusa upotrebom komercijalnog kita *RIDA®GENE Norovirus I & II (R-Biopharm AG, Germany)* i određivanje pripadnosti grupi A rotavirusa sa komercijalnim kitom *Rotavirus A genesig (Primerdesign, United Kingdom)*. Grupa A rotavirusa čini više od 90% rotavirusnih infekcija u svetu.

Real-time RT-PCR reakcija za određivanje genogrupe norovirusa je vršena u zapremini od 25µl (20µl Master miksa i 5µl ispitivane norovirusne pozitivne RNK - uzorak, kao i pozitivne i negativna kontrole). U sastav Master miksa – reakcione mešavine ulazile su sledeće komponente: *Reaction Mix, Primer-Probe Mix, Enzyme Mix*. Reverzna transkripcija je izvođena 10 minuta na 58°C, a zatim je vršena početna denaturacija 1 minut na 95°C. Proces amplifikacije se izvodio u 45 ciklusa, pod sledećim uslovima: 15 sekundi na 95 °C i 30 sekundi na 55°C. Amplifikacija i detekcija genogrupe norovirusa je vršena u aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Kod određivanja pripadnosti grupi A rotavirusa, *real-time RT-PCR* reakcija je bila zapremine 20µl. Reakciona smeša je dodavana u zapremini od 15 µl. Ispitivana rotavirusna pozitivna RNK (uzorak), kao i pozitivna i negativna kontrola dodavani su u zapremini od 5µl. U sastav reakcione mešavine ulazile su sledeće komponente: *oasig™ OneStep qRT-PCR Master Mix, Rotavirus A Primer/Probe mix* i *RNase/DNase free water*. Reverzna transkripcija je izvođena 10 minuta na 42°C, a zatim je vršena aktivacija enzima DNK polimeraze 2 minuta na 95°C. Proces amplifikacije se izvodio u 50 ciklusa, pod sledećim uslovima: 10 sekundi na 95 °C i 60 sekundi na 60°C. Amplifikacija i detekcija rotavirusa grupe A je vršena u aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

5.2.2. Metode određivanja nukleotidnih sekvenci

5.2.2.1. Amplifikacija dela hekson gena kod adenovirusa

Za potrebe sekvenciranja, specifičan segment hekson gena adenovirusa, dužine 301 bazni par (bp), je umnožen lančanom reakcijom polimeraze (*PCR*). Za umnožavanje DNK fragmenata,

korišćen je *AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems)* uz upotrebu prajmera (hex1deg/hex2deg), čije su sekvence prikazane u tabeli 4.

Tabela 4. Oligonukleotidna sekvenca hex1deg/hex2deg prajmera

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina amplikona (bp)	Referenca
Hekson	hex1deg	5'-GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C-3'	301	Allard i sar., 2001. (141)
HAdV	hex2deg	5'-CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA-3'		

Varijabilne nukleotidne pozicije: S=C ili G; R=A ili G; K=G ili T; W=A ili T

PCR reakciona smeša, ukupne zapremine od 25 µl po reakciji, obuhvatala je sledeće komponente: 12,5µl *AmpliTaq Gold PCR Master Mix-a*; 1µl prajmera hex1deg (konc.10 µmol); 1µl hex2deg prajmera (konc.10 µmol), 5,5µl *RNAse/DNAse free* vode i 5µl izolovane DNK. Reakcija cikličnog umnožavanja odabranog fragmenta je rađena na PCR aparatu (*Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany*).

Umnožavanje ciljane sekvence je izvedeno po sledećem protokolu: (1) inicijalna denaturacija DNK i aktivacija DNK polimeraze: 9 minuta na 95°C; (2) replikacioni ciklus se ponavljao 40 puta i sastojao od 3 koraka: 60 sekundi na 95°C, 60 sekundi na 55°C, 70 sekundi na 72°C; (3) završna ekstenzija (izduživanje) DNK lanaca: 8 minuta na 72°C i (4) završetak reakcije na 4°C. U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola i negativna kontrola (NT, eng. *no template*). Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

5.2.2.2. Amplifikacija delova ORF1b i ORF2 kod astrovirusa

Za potrebe sekvenciranja umnožen je *RT-PCR* reakcijom veoma stabilan region ORF1b (RNK polimeraza) astrovirusa dužine 409 bp. Za umnožavanje RNK fragmenata, korišćen je *SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen)* uz upotrebu prajmera (SF0073/SF0076), čije su sekvence prikazane u tabeli 5. Ovaj region je stabilan kod svih humanih i animalnih astrovirusa, pa se ovi prajmeri smatraju konsenzus prajmerima i omogućili su identifikaciju svih astrovirusa.

Tabela 5. Oligonukleotidna sekvenca SF0073/SF0076 prajmera

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina ampikona (bp)	Referenca
ORF1b	SF0073	5' - GATTGGACTCGATTGATGG - 3'	409	Finkbeiner i sar., 2009. (105)
AstV	SF0076	5' - CTGGCTTAACCCACATTCC - 3'		

PCR reakciona smeša, ukupne zapremine od 25µl po reakciji, obuhvatala je sledeće komponente: 0,5µl *SuperScript III Platinum Taq Mix*; 12,5µl *2x Reaction Mix*; 1µl *MgSO4 conc.*; 0,5µl prajmera SF0073 (konc.10 µmol); 0,5µl prajmera SF0076 (konc.10 µmol), 7,5µl *RNase/DNase free* vode i 2,5µl izolovane RNK. Reakcija cikličnog umnožavanja odabranog fragmenta je rađena na PCR aparatu (*Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany*).

Umnožavanje ciljane sekvence je izvedeno po sledećem protokolu: (1) reverzna transkripcija: 15 minuta na 50°C, a zatim inaktivacija RNK polimeraze i aktivacija DNK polimeraze 2 minuta na 95°C (2) replikacioni ciklus se ponavljao 40 puta i sastojao od 3 koraka: 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 53°C, 50 sekundi na 72°C. U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola i negativna kontrola (NT, eng. *no template*). Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

Amplifikacija stabilnog 5' ORF2 kod astrovirusa

Za potrebe sekvenciranja umnožen je *RT-PCR* reakcijom stabilan 5' region ORF2 klasičnih astrovirusa dužine 449 bp. Za umnožavanje RNK fragmenata korišćen je *SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen)* uz upotrebu prajmera (Mon269/Mon270), čije su sekvence prikazane u tabeli 6. Ovi prajmeri omogućavaju identifikaciju samo klasičnih astrovirusa, koji su i najučestaliji kao uzročnici infekcija kod ljudi.

Tabela 6. Oligonukleotidna sekvenca Mon269/Mon270 prajmera

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina ampikona (bp)	Referenca
ORF2	Mon269	5' - CAACTCAGGAAACAGGGTGT - 3'	449	Finkbeiner i sar., 2009. (105)
AstV	Mon270	5' - TCAGATGCATTGTCATTGGT - 3'		

RT-PCR reakciona smeša, ukupne zapremine od 25µl po reakciji, obuhvatala je sledeće komponente: 0,5µl *SuperScript III Platinum Taq Mix*; 12,5µl *2x Reaction Mix*; 1µl *MgSO4 conc.*; 0,5µl prajmera Mon269 (konc.10 µmol); 0,5µl prajmera Mon270 (konc.10 µmol), 7,5µl

RNAse/DNAse free vode i 2,5µl izolovane RNK. Reakcija cikličnog umnožavanja odabranog fragmenta je rađena na PCR aparatu (*Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany*).

Umnožavanje ciljane sekvence je izvedeno po sledećem protokolu: (1) reverzna transkripcija: 15 minuta na 50°C, a zatim inaktivacija RNK polimeraze i aktivacija DNK polimeraze 2 minuta na 95°C (2) replikacioni ciklus se ponavljao 40 puta i sastojao od 3 koraka: 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 51,9°C, 50 sekundi na 72°C. U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola i negativna kontrola (NT, eng. *no template*). Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

5.2.2.3. Amplifikacija dela ORF2 kod norovirusa

Za potrebe sekvenciranja umnožen je RT-PCR reakcijom C region (5' kraj) ORF2 norovirusa dužine oko 300 bp. Za umnožavanje RNK fragmenata, korišćen je *Qiagen One-Step RT-PCR Kit (Qiagen inc., Valencia CA, USA)* uz upotrebu prajmera specifičnih za genogrupu (genogrupa I -G1SKF/G1SKR i genogrupa II – G2SKF/G2SKR), čije su sekvence prikazane u tabeli 7.

Tabela 7. Oligonukleotidna sekvence G1SKF/G1SKR prajmera (za genogrupu I) i G2SKF/G2SKR prajmera (za genogrupu II)

Ciljna sekvence	Naziv prajmera	Sekvencija prajmera	Veličina amplikona (bp)	Referenca
ORF2 NoV GI	G1SKF G1SKR	5' - CTGCCCGAATTYGTAAATGA - 3' 5' - CCAACCCARCCATTRTACA - 3'	329	Kojima i sar., 2002. (142)
ORF2 NoV GII	G2SKF G2SKR	5' - CNTGGGAGGGCGATCGCAA - 3' 5' - CCRCNGCATRHCCRTTRTACAT - 3'	343	Kojima i sar., 2002. (142)

Varijabilne nukleotidne pozicije: Y=C ili T; R=A ili G; N=A ili C ili G ili T; H=A ili C ili T

RT-PCR reakciona smeša, ukupne zapremine od 25µl po reakciji, obuhvatala je sledeće komponente: 5µl *Qiagen One-Step RT-PCR buffer*; 1µl *dNTP*; 1µl *Qiagen One-Step RT-PCR Enzyme mix*; 0,25µl *Forward* prajmera (G1SKF ili G2SKF, konc.100 µmol); 0,25µl *Reverse* prajmera (G1SKR ili G2SKR, konc.10 µmol); 13,5µl *RNAse/DNAse free* vode i 4µl izolovane RNK. Reakcija cikličnog umnožavanja odabranog fragmenta je rađena na PCR aparatu (*Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany*).

Umnožavanje ciljane sekvence je izvedeno po sledećem protokolu: (1) reverzna transkripcija: 30 minuta na 50°C, a zatim inaktivacija RNK polimeraze i aktivacija DNK polimeraze 15 minuta na 95°C (2) replikacioni ciklus se ponavljao 40 puta i sastojao od 3 koraka: 30 sekundi na

94°C, 1 minut na 52°C, 1 minut na 72°C (3) završna ekstenzija: 10 minuta na 72°C i (4) završetak reakcije na 4°C. U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola i negativna kontrola (NT, eng. *no template*). Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

5.2.2.4. Amplifikacija gena 9 (VP7) i gena 4 (VP4) kod rotavirusa

Za potrebe sekvenciranja umnožen je *RT-PCR* reakcijom gen 9 rotavirusa dužine 1062 bp. Takođe, *RT-PCR* reakcijom umnožen je i deo gena 4 rotavirusa dužine 663 bp. Za umnožavanje RNK fragmenata, korišćen je *Qiagen One-Step RT-PCR Kit* (*Qiagen inc., Valencia CA, USA*) uz upotrebu prajmera (Beg9/End9 za gen 9 i VP4F/VP4R za gen 4), čije su sekvence prikazane u tabeli 8. Gen 9 rotavirusa vrši kodiranje VP7 proteina na površini virusa, na osnovu koga se vršilo određivanje G tipa rotavirusa grupe A (G tipizacija). Gen 4 kodira VP4 protein na površini virusa, na osnovu koga se vršilo određivanje P tipa rotavirusa grupe A (P tipizacija).

Tabela 8. Oligonukleotidna sekvenca Beg9/End9 prajmera (za gen 9) i VP4F/VP4R prajmera (za gen 4)

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Veličina amplikona (bp)	Referenca
Gen 9 RV	Beg9	5'- GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3'	1062	WHO, 2009. (78)
	End9	5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG-3'		
Gen 4 RV	VP4F	5'-TATGCTCCAGTNAATTGG-3'	663	WHO, 2009. (78)
	VP4R	5'-ATTGCATTCTTTCCATAATG-3'		

Zbog specifičnosti genoma virusa (dvolančana RNK), uzorak izolovane RNK (4µl) se zajedno sa odgovarajućim prajmerima (Beg9/End9 za gen 9 i VP4F/VP4R za gen 4; koncentracije 100 µmol, oba u količini od po 0,5µl) prvo zagrevao na temperaturi od 94°C 5 minuta, a zatim držao na ledu 1 minut (miks 1). Za to vreme pravila se mešavina enzima i pufera (miks 2) na sledeći način: dodavalo se 5µl *Qiagen One-Step RT-PCR buffer*; 1µl *dNTP*; 1µl *Qiagen One-Step RT-PCR Enzyme mix* i 13µl *RNAse/DNAse free* vode. PCR reakciona smeša ukupne zapremine od 25µl po reakciji, obuhvatala je sledeće komponente: 5µl miksa 1 sa uzorkom RNK i 20 µl miksa 2. Reakcija cikličnog umnožavanja odabranog fragmenta je rađena na PCR aparatu (*Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg, Germany*).

Umnožavanje ciljane sekvence je izvedeno po sledećem protokolu: (1) reverzna transkripcija: 30 minuta na 50°C, zatim 15 minuta na 95°C vršila se aktivacija DNK polimeraze (2) replikacioni ciklus se ponavljao 40 puta i sastojao od 3 koraka: 1 minut na 94°C, 2 minuta na 42°C,

1 minut na 72°C (3) završna ekstenzija: 10 minuta na 72°C i (4) završetak reakcije na 4°C. U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola i negativna kontrola (NT, eng. *no template*). Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

5.2.2.5. Prečišćavanje PCR produkata

Nakon dobijanja pozitivnog rezultata na agaroznom gelu (produkata očekivane veličine), u cilju sekvenciranja izvršeno je prečišćavanje PCR produkata upotrebom komercijalnog kompleta (*QIAquick PCR Purification Kits*; QIAGEN: P/N 28104) prema uputstvu proizvođača.

Upotrebom ovog kita, prečišćavanje PCR produkata se odvijalo u ultrafiltracionim spin kolonama. U prvom koraku vršila se adsorpcija umnožene DNK za površinu silika membrane u prisustvu pufera (pH<7,5) i visoke koncentracije soli. Tokom faze adsorpcije prajmeri i ostale nečistoće (neinkorporirani nukleotidi, agarozna, boje, etidijum bromid, ulja, deterdženti i soli) prolazili su kroz kolonu, ne vezujući se za silika membranu. Rezidue soli ispirale su se puferom PE, koji sadrži etanol. Višak PE pufera uklanjao se centrifugiranjem. Elucija DNK vršila se EB puferom (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Kvalitet prečišćenih fragmenata proveravan je na 2% agaroznom gelu. Koncentracija i čistoća eluata određivana je merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm.

5.2.2.6. Sekvenciranje delova genoma ispitivanih virusa

Za potrebe ovog istraživanja određeni broj uzoraka, koji su bili pozitivni na ispitivane viruse (rotaviruse, noroviruse, astroviruse i adenoviruse), a u cilju potvrde uspešnosti detekcije virusa u ispitivanim uzorcima, genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, pripremljeni su za sekvenciranje po uputstvu laboratorije angažovane za sekvenciranje (*Macrogen*, Holandija). Uzorci su sekvencirani u dužini jednog dela genoma (region od interesa) metodom po Sangeru na instrumentu *ABI 3730XL* u laboratoriji *Macrogen Europe*, Holandija. Za sekvenciranje su upotrebljeni isti prajmeri, koji su korišćeni i za proces amplifikacije.

5.2.3. Bioinformatička obrada podataka

Dobijanje konsenzus sekvenci

Eksperimentalno dobijene nukleotidne sekvence analizirane su u cilju provere kvaliteta sekvenciranja. Sekvence su proverene u oba pravca pomoću programa FinchTV (Geospiza, Inc.) i izvršena je manuelna obrada praznina. Upoređivanje (engl. *alignment*) dobijenih sekvenci u 5' i 3'

pravcu izvršeno je upotrebom on-line programa Clustal Omega. Na taj način dobijena je kompletna (konsenzus) sekvenca, koja je u cilju identifikacije dalje analizirana.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Upotrebom BLAST programa (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) (143) konsenzus sekvence su upoređene sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma rota, noro, astro i adenovirusa, dostupnim u „GenBank“ bazi podataka (*National Center for Biotechnology Information, Nacional Institutes, NCBI database*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

Filogenetska analiza je prvo obuhvatala poravnavanje setova sekvenci, sa ciljem da broj neuparenih mesta u ispitivanim sekvencama bude što manji, primenom CLUSTAL W algoritma u okviru MEGA 6.0 (engl. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) softverskog paketa. MEGA program je bioinformatički alat, koji pored programa za poravnanje sekvenci *Clustal W* (144), sadrži programe za konstruisanje filogenetskih stabala, pretragu baze podataka (*PubMed, BLAST*), procenu stope mutacija, testiranje evolutivnih hipoteza i određivanje genetičkih distanci.

Algoritam maksimalne verovatnoće (engl. *Maximum likelihood*) i algoritam pridruživanja taksona (engl. *Neighbor joining*) u programu MEGA upotrebljeni su za procenu evolutivne srodnosti sekvenci, određivanje njihove evolutivne udaljenosti i konstrukciju filogenetskih stabala. Butstrep analiza (engl. *Bootstrap*) je urađena u većem broju ponavljanja (1000) u cilju provere stabilnosti i izračunavanja statističke podrške topologiji stabla. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti koriscen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0. MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

Baze podataka

U cilju definisanja filogenetskih odnosa izolata ispitivanih virusa (rota, noro, astro i adenovirusa) iz Srbije u odnosu na izolate ovih virusa iz Evrope i ostalih geografskih područja u svetu, u radu su korišćene sekvence navedene u NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka. NCBI predstavlja skup nukleotidnih i proteinskih sekvenci iz nekoliko izvora, uključujući *GenBank, RefSeq* (eng. *Reference Sequence Database*). Sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za potrebe ovog istraživanja su prikazane u tabeli 9A za adenovirus, tabeli 9B za astrovirus, tabeli 9C za norovirus i tabeli 9D za rotavirusni gen 4 (VP4) i tabeli 9E za rotavirusni gen 9 (VP7).

Tabela 9A. Nukleotidne sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za adenovirusni gen heksona preuzete iz GenBank baze podataka

Broj	Vrsta	Grupa	Serotip	Broj nukleotida	<i>GenBank accession no.</i>
1	Human adenovirus	F	40	34214 bp	NC_001454
2	Human adenovirus	F	40	238 bp	HQ268788
3	Human adenovirus	F	40	257 bp	KY910941
4	Human adenovirus	F	40	255 bp	KX570632
5	Human adenovirus	F	41	255 bp	KX570635
6	Human adenovirus	F	41	1235 bp	HQ005286
7	Human adenovirus	F	41	252 bp	DQ504432
8	Human adenovirus	F	41	256 bp	LT628548
9	Human adenovirus	F	41	2778 bp	AB330122
10	Human adenovirus	C	2	2907 bp	KM458625
11	Human adenovirus	C	2	259 bp	EF205292
12	Human adenovirus	C	2	35937 bp	AC_000007
13	Human adenovirus	C	2	253 bp	AY628143
14	Human adenovirus	C	2	2907 bp	AJ293905
15	Human adenovirus	B	7	35214 bp	KU361344
16	Human adenovirus	B	3	35343 bp	NC_011203
17	Human adenovirus	D	17	35139 bp	HQ910407
18	Human adenovirus	D	17	35100 bp	AC_000006
19	Human adenovirus	A	12	34125 bp	NC_001460
20	Human adenovirus	A	12	34125 bp	X73487
21	Human adenovirus	E	4	35994 bp	NC_003266
22	Human adenovirus	E	4	35983 bp	KX384950
23	Human adenovirus	G	52	34250 bp	DQ923122
24	Bovine adenovirus	/	/	4693 bp	NC_005889

Tabela 9B. Nukleotidne sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za stabilan 5' region ORF2 klasičnih astrovirusa preuzete iz GenBank baze podataka

Broj	Vrsta	Grupa	Serotip	Broj nukleotida	GenBank accession no.
1	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	6813 bp	NC_001943
2	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	6816 bp	HQ398856
3	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	373 bp	KC285180
4	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	443 bp	AY846639
5	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	409 bp	KM514348
6	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	389 bp	KX027308
7	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	626 bp	JQ898572
8	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	1	719 bp	KM981712
9	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	6	348 bp	DQ917382
10	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	6	2418 bp	Z46658
11	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	3	2478 bp	EF583300
12	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	3	682 bp	AB551378
13	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	7	2484 bp	Y08632
14	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	7	348 bp	L38508
15	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	5	5623 bp	KF157967
16	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	5	426 bp	JQ260761
17	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	5	1154 bp	KX932052
18	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	5	621 bp	KF420152
19	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	5	366 bp	KX913268
20	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	5	6762 bp	DQ028633
21	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	2	3233 bp	JX087964
22	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	2	1154 bp	KX932051
23	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	8	6759 bp	AF260508
24	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	8	2434 bp	Z66541
25	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	4	348 bp	AF175259
26	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	4	348 bp	EU161566
27	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	4	348 bp	AF348793
28	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	4	348 bp	DQ157435
29	Human astrovirus	Mamastrovirus 1	4	6723 bp	AY720891
30	Bovine astrovirus	unclassified Mamastrovirus	/	6287 bp	LC047787

Tabela 9C. Nukleotidne sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za C region (5' kraj) ORF2 norovirusa preuzete iz GenBank baze podataka

Broj	Vrsta	Grupa	Genotip	Broj nukleotida	GenBank accession no.
1	Human norovirus	Genogrupa I	2	271 bp	KU821055
2	Human norovirus	Genogrupa I	2	7699 bp	FJ515294
3	Human norovirus	Genogrupa I	2	315 bp	KM462611
4	Human norovirus	Genogrupa I	2	7708 bp	L07418
5	Human norovirus	Genogrupa II	1	288 bp	KP762423
6	Human norovirus	Genogrupa II	1	2193 bp	KC597151
7	Human norovirus	Genogrupa II	1	281 bp	JX863528
8	Human norovirus	Genogrupa II	1	292 bp	KF475929
9	Human norovirus	Genogrupa II	1	282 bp	KF870593
10	Human norovirus	Genogrupa II	1	481 bp	KU193696
11	Human norovirus	Genogrupa II	1	575 bp	KT239610
12	Human norovirus	Genogrupa II	1	7513 bp	U07611
13	Human norovirus	Genogrupa II	2	7537 bp	AY134748
14	Human norovirus	Genogrupa II	2	338 bp	EU007805
15	Human norovirus	Genogrupa II	2	2329 bp	AB662898
16	Human norovirus	Genogrupa II	2	7536 bp	KY421122
17	Human norovirus	Genogrupa II	2	1067 bp	KY817521
18	Human norovirus	Genogrupa II	2	2005 bp	KY357462
19	Human norovirus	Genogrupa II	4	7555 bp	X86557
20	Human norovirus	Genogrupa II	4	327 bp	KP871791
21	Human norovirus	Genogrupa II	4	276 bp	EU908204
22	Human norovirus	Genogrupa II	4	2327 bp	KJ634714
23	Human norovirus	Genogrupa II	4	7531 bp	KF509946
24	Human norovirus	Genogrupa II	4	7513 bp	KT202796
25	Human norovirus	Genogrupa II	4	2334 bp	EU096506
26	Human norovirus	Genogrupa II	17	1623 bp	KT591501
27	Human norovirus	Genogrupa II	17	7397 bp	KY392867
28	Human norovirus	Genogrupa II	17	2353 bp	KX424647
29	Human norovirus	Genogrupa II	17	3266 bp	KT346356
30	Human norovirus	Genogrupa II	17	7559 bp	KT780416
31	Human norovirus	Genogrupa II	17	7555 bp	LC037415
32	Bovine calicivirus	/	/	7484 bp	NC_030793

Tabela 9D. Nukleotidne sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za gen 4 (VP4) rotavirusa preuzete iz GenBank baze podataka

Broj	Vrsta	Grupa	P genotip	Broj nukleotida	GenBank accession no.
1	Human rotavirus	A	P[8]	664 bp	MF494873
2	Human rotavirus	A	P[8]	789 bp	KF614647
3	Human rotavirus	A	P[8]	801 bp	KF036131
4	Human rotavirus	A	P[8]	843 bp	KJ432862
5	Human rotavirus	A	P[8]	845 bp	EU033988
6	Human rotavirus	A	P[8]	2354 bp	KU870410
7	Human rotavirus	A	P[8]	2359 bp	JN849137
8	Human rotavirus	A	P[8]	2337 bp	FJ747616
9	Human rotavirus	A	P[8]	2313 bp	AB975556
10	Human rotavirus	A	P[8]	2354 bp	KU059791
11	Human rotavirus	A	P[8]	810 bp	JN706174
12	Human rotavirus	A	P[8]	878 bp	KJ454524
13	Human rotavirus	A	P[8]	2333 bp	JF491069
14	Human rotavirus	A	P[8]	2359 bp	KF371777
15	Human rotavirus	A	P[4]	869 bp	KJ940113
16	Human rotavirus	A	P[4]	664 bp	KU174024
17	Human rotavirus	A	P[4]	901 bp	JX307596
18	Human rotavirus	A	P[4]	808 bp	KX545322
19	Human rotavirus	A	P[4]	849 bp	KF202512
20	Human rotavirus	A	P[4]	663 bp	MF494861
21	Human rotavirus	A	P[4]	2307 bp	KJ919709
22	Human rotavirus	A	P[4]	2359 bp	JN849155
23	Human rotavirus	A	P[8]	2359 bp	L34161
24	Human rotavirus	A	P[4]	2359 bp	HQ650119
25	Simian rotavirus	A	/	2362 bp	NC011510

Tabela 9E. Nukleotidne sekvence u filogenetskoj analizi za gen 9 (VP7) rotavirusa preuzete iz GenBank baze podataka

Broj	Vrsta	Grupa	G genotip	Broj nukleotida	GenBank accession no.
1	Human rotavirus	A	G1	1062 bp	JX406755
2	Human rotavirus	A	G1	882 bp	MF494779
3	Human rotavirus	A	G1	900 bp	JX273716
4	Human rotavirus	A	G1	827 bp	AB546868
5	Human rotavirus	A	G1	1011 bp	JX027828
6	Human rotavirus	A	G1	948 bp	AB975460
7	Human rotavirus	A	G1	912 bp	KX758605
8	Human rotavirus	A	G1	948 bp	KT948654
9	Human rotavirus	A	G1	1062 bp	LC066655
10	Human rotavirus	A	G1	1062 bp	FJ348350
11	Human rotavirus	A	G2	1062 bp	HQ650124
12	Human rotavirus	A	G2	1017 bp	MF168276
13	Human rotavirus	A	G2	981 bp	HQ425266
14	Human rotavirus	A	G2	943 bp	KJ919920
15	Human rotavirus	A	G2	850 bp	KF414556
16	Human rotavirus	A	G2	1062 bp	AF401754
17	Human rotavirus	A	G2	1062 bp	JQ343219
18	Human rotavirus	A	G2	978 bp	JN849156
19	Human rotavirus	A	G2	1062 bp	DQ904516
20	Human rotavirus	A	G3	981 bp	FJ998278
21	Human rotavirus	A	G3	1062 bp	KU550297
22	Human rotavirus	A	G3	1062 bp	KU870415
23	Human rotavirus	A	G3	885 bp	MF494838
24	Human rotavirus	A	G3	1062 bp	KJ639028
25	Human rotavirus	A	G3	1002 bp	KY000546
26	Human rotavirus	A	G3	1062 bp	KU059782
27	Human rotavirus	A	G9	981 bp	FJ361209
28	Human rotavirus	A	G9	840 bp	KU532195
29	Human rotavirus	A	G9	885 bp	KF648937
30	Human rotavirus	A	G9	996 bp	AB848997
31	Human rotavirus	A	G9	1023 bp	KT919508
32	Human rotavirus	B	/	814 bp	NC_021542

5.3. Određivanje težine kliničke slike kod obolelih

Vesikari skala (prvi put opisana od strane Vesikari i Ruuska 1987. god., a Lewis publikovao modifikovanu verziju 2011. god.) ima za cilj da odredi težinu kliničke slike kod obolelih od virusnog gastrointestinalnog sindroma. Analizirajući podatke, uzete iz navoda o kliničkoj slici kod svakog obolelog (anketni upitnik i istorija bolesti), grupisani su oboleli od virusnog gastroenterokolitisa u kategorije:

1. bolesnici sa blagom kliničkom slikom (koji su posle analize i sabiranja svih kliničkih parametara, predviđenih Vesikari skalom, imali ukupan broj bodova manje od 7)
2. bolesnici sa srednje teškom kliničkom slikom (sa ukupnim brojem bodova 7 do 10)
3. bolesnici sa teškom kliničkom slikom (sa ukupnim brojem bodova 11 ili većim).

Bodovi se računaju tako, što se sabira maksimalni broj stolica dnevno, trajanje dijareje u danima, maksimalan broj povraćanja dnevno, trajanje povraćanja u danima, temperatura (rektalna ili aksilarna), dehidracija (da li je ima i kolika je), kao i lečenje (da li je samo izvršena rehidracija, ili ima i hospitalizacije obolelog) (tabela 10A). Iz tabele se vidi koliko bodova nosi svaki od prisutnih kliničkih simptoma. Ove vrednosti se na kraju sabiraju i daju ukupan broj bodova. To opredeljuje određivanje u Vesikari skali da li je kod obolelog blaga klinička slika (manje od 7 bodova), srednje teška klinička slika (7 do 10 bodova), ili teška klinička slika (11 ili više bodova) (145).

Tabela 10A. Vesikari skala za određivanje težine kliničke slike (parametri i bodovi)

SKALA			
PARAMETAR	1	2	3
Maksimalan broj stolica dnevno	1-3	4-5	≥ 6
Trajanje dijareje u danima	1-4	5	≥ 6
Maksimalan broj povraćanja dnevno	1	2-4	≥ 5
Trajanje povraćanja u danima	1	2	≥ 3
Temperatura (rektalna/aksilarna)	37,1-38,4 °C / 36,6-37,9 °C	38,5-38,9 °C / 38-38,4 °C	≥ 39 °C / $\geq 38,5$ °C
Dehidracija	/	1-5%	≥ 6
Lečenje	Rehidracija	Hospitalizacija	/

Tabela 10B. Vesikari skala za određivanje težine kliničke slike (grupisanje u kategorije)

KATEGORIJE			
Blaga klinička slika	Srednje teška klinička slika	Teška klinička slika	Maksimalan broj bodova
< 7	7 - 10	≥ 11	20

5.4. Statistička analiza

Svi utvrđeni podaci, dobijeni nakon dijagnostičkog testiranja celokupnog uzorka *real-time RT-PCR* i *real-time PCR* testom, bili su analizirani, statistički obrađeni, tabelarno i grafički prikazani u odnosu na vrstu virusnog uzročnika, koji je dokazan kao izazivač bolesti, zatim, prema uzrastu tj. starosti obolelih osoba, kao i prema godinama trajanja ovog istraživanja.

Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket *Statistical Package for Social Sciences - SPSS 21*. Numerička obeležja su prikazana putem srednjih vrednosti (aritmetička sredina) i mera varijabiliteta (opseg vrednosti, standardna devijacija), a atributivna obeležja korištenjem frekvencija i procenata. Komparacija vrednosti numeričkih obeležja između dve grupe vršena je primenom Studentovog T-testa, dok je za poređenje vrednosti između tri ili više grupa podataka primenjena jednosmerna analiza varijanse (ANOVA). Testiranje razlike frekvencija atributivnih obeležja vršeno je primenom χ^2 testa. Ispitivanje povezanosti dva obeležja vršeno je primenom Pearsonovog koeficijenta korelacije. Statistički značajnim se smatraju vrednosti nivoa značajnosti $p < 0.05$. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Pored bročane, procentualne, tabelarne i statističke obrade učestalosti svih kliničkih parametara kod obolelih od virusnog gastrointestinalnog sindroma i to pojedinačno kod obolelih sa utvrđenom infekcijom rota, noro, astro ili enteričnim adenovirusima, kao i kod bolesnika u svim starosnim grupama, analiza težine kliničke slike kod svakog obolelog urađena je i na osnovu parametara datih u Vesikari skali.

6.0. Rezultati

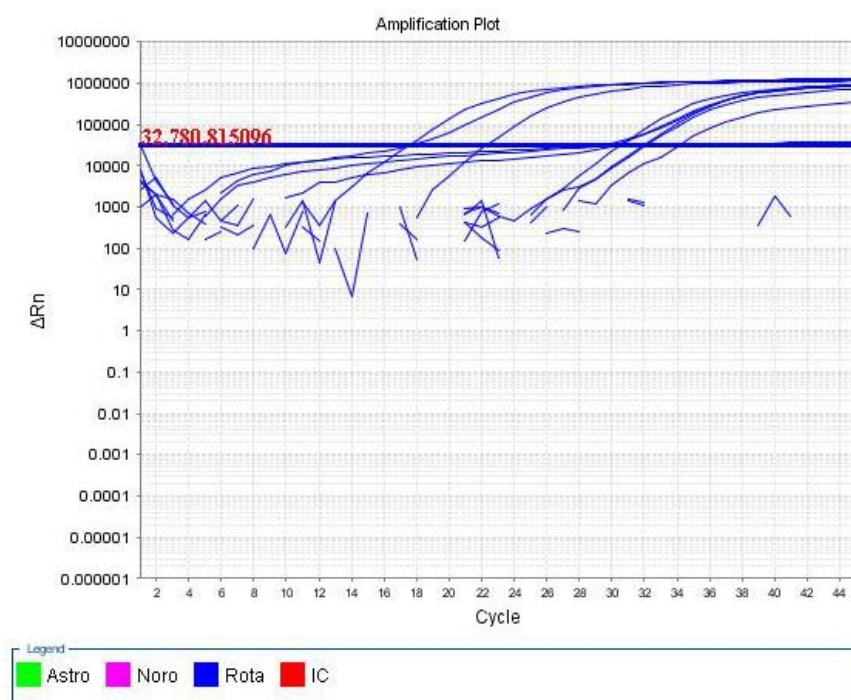
6.1. Rezultati prikazani prema godinama trajanja istraživanja, vrsti virusnih uzročnika i starosti obolelih

U petogodišnjem periodu (2012-2016. god.) *real-time RT-PCR* i *real-time PCR* molekularnim testovima pregledani su uzorci stolice 1003 osobe, starosti od mesec dana do preko 90 godina. Rađena je dijagnostika virusa, koji su najčešći uzročnici akutnog gastroenterokolitisa: rotavirusa, norovirusa, astrovirusa, kao i enteričnih adenovirusa. Sve pregledane osobe imale su simptome akutnog dijarealnog sindroma. Pored pregleda uzoraka stolice molekularnim testom, analizirani su i podaci o simptomima bolesti, trajanju bolesti, hospitalizaciji, kao i sporadičnom i epidemijском javljanju bolesti.

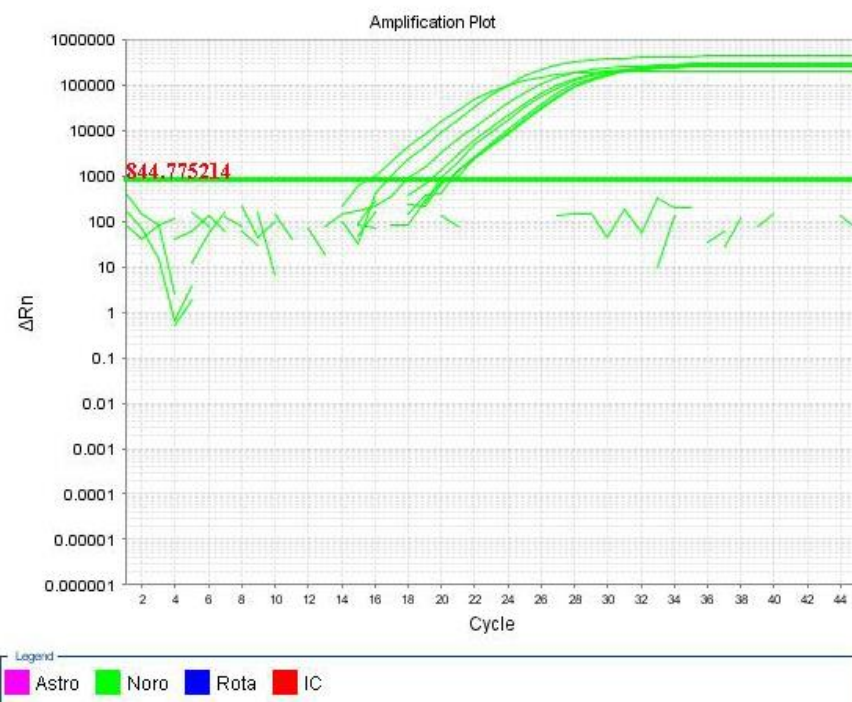
Na ukupnom uzorku od 1003 pregledane osobe, akutna infekcija izazvana rota, noro, astro, kao i enteričnim adenovirusima dokazana je kod ukupno 709 osoba svih starosnih grupa, odnosno u 70,69% slučajeva.

U ovom petogodišnjem periodu od 709 bolesnika sa dokazanom akutnom infekcijom, njih 677 je bilo pozitivno na jedan virus (rota, noro, astro ili adenovirus), a 32 osobe su bile pozitivne na dva virusa (3,19%).

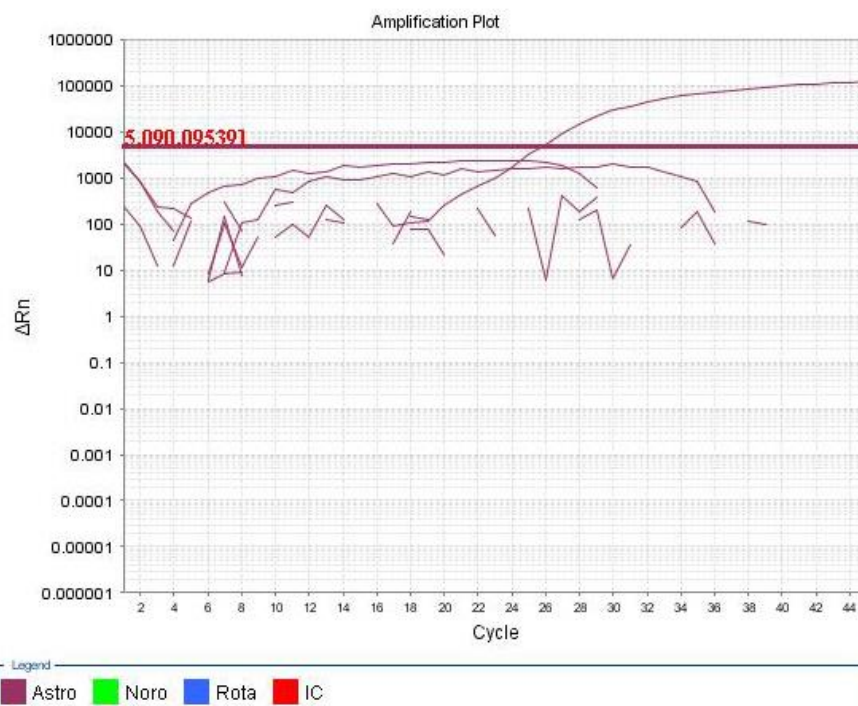
Na slikama 15, 16, 17 i 18 prikazane su amplifikacione krive, dobijene prilikom izvođenja *real-time RT-PCR* testa u dijagnostici rota, noro i astrovirusa, kao i *real-time PCR* testa u dijagnostici adenovirusa. U daljem tekstu termin *real-time PCR* test odnosiće se i na *real-time RT-PCR* test (kod RNK virusa), kao i na *real-time PCR* test (kod DNK virusa).



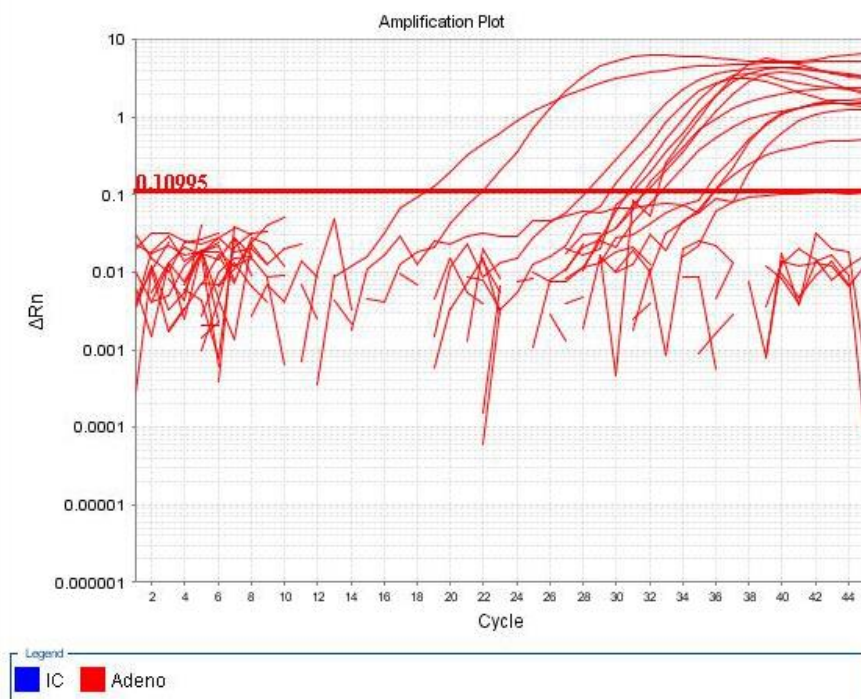
Slika 15. Detekcija rotavirusa u uzorcima stolice metodom *real-time RT-PCR*



Slika 16. Detekcija norovirusa u uzorcima stolice metodom *real-time RT-PCR*



Slika 17. Detekcija astrovirusa u uzorcima stolice metodom *real-time RT-PCR*



Slika 18. Detekcija adenovirusa u uzorcima stolice metodom *real-time PCR*

U tabeli 11 prikazani su rezultati pregleda 100 osoba u 2012. godini. Dobijeni rezultati su grupisani u odnosu na broj dokazanih akutnih infekcija određenim virusom i u odnosu na starost pregledanih osoba. Tako je u 2012. godini na rota, noro, astro i adenoviruse, na uzorku od 100 pregledanih osoba različite starosti, pozitivnih na ova četiri virusa bilo ukupno 68% (68/100). U 2012. godini kod 5 obolelih (5,0%), uzrasta do 5 godina, 6 do 14 godina i 15 do 19 godina dokazana je udružena infekcija sa 2 virusa. Radilo se o rota i norovirusima kod svih 5 obolelih.

U tabeli 12, gde su prikazani rezultati pregleda 179 osoba u 2013. godini, ukupan broj pozitivnih na rota, noro, astro i enterične adenoviruse je bio 98 od 179 pregledanih – 54,75%. U 2013. godini nisu u uzorcima stolice dokazane udružene infekcije sa dva virusa.

Tabela 11. Učestalost akutnih infekcija izazvanih rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima u 2012. godini

STAROST	ROTA	NORO	ASTRO	2* VIRUSA	ADENO	UKUPNO	
						NEGATIVNI	POZITIVNI
0-5 god	27/72 (37.5%)	11/72 (15.28%)	1/72 (1.39%)	2/72 (2.78%)	6/72 (8.33%)	25/72 (34.72%)	47/72 (65.28%)
6-14 god	1/15 (6.67%)	4/15 (26.67%)	3/15 (20.0%)	2/15 (13.33%)	4/15 (26.67%)	1/15 (6.67%)	14/15 (93.33%)
15-19 god	/	1/6 (16.67%)	/	1/6 (16.67%)	/	4/6 (66.67%)	2/6 (33.33%)
20-29 god	/	2/3 (66.67%)	/	/	/	1/3 (33.33%)	2/3 (66.67%)
30-49 god	/	2/3 (66.67%)	/	/	/	1/3 (33.33%)	2/3 (66.67%)
≥50 god	1/1 (100.0%)	/	/	/	/	/	1/1 (100.0%)
UKUPNO	29/100 (29.0%)	20/100 (20.0%)	4/100 (4.0%)	5/100 (5.0%)	10/100 (10.0%)	32/100 (32.0%)	68/100 (68.0%)

broj pozitivnih/broj ispitanih

% pozitivnih

* udružene infekcije sa dva virusa

Tabela 12. Učestalost akutnih infekcija izazvanih rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima u 2013. godini

STAROST	ROTA	NORO	ASTRO	2* VIRUSA	ADENO	UKUPNO	
						NEGATIVNI	POZITIVNI
0-5 god	24/91 (26.37%)	15/91 (16.48%)	2/91 (2.20%)	/	10/91 (10.99%)	40/91 (43.96%)	51/91 (56.04%)
6-14 god	6/21 (28.57%)	1/21 (4.76%)	/	/	4/21 (19.05%)	10/21 (47.62%)	11/21 (52.38%)
15-19 god	1/18 (5.56%)	5/18 (27.78%)	/	/	3/18 (16.67%)	9/18 (50.0%)	9/18 (50.0%)
20-29 god	1/15 (6.67%)	4/15 (26.67%)	/	/	1/15 (6.67%)	9/15 (60.0%)	6/15 (40.0%)
30-49 god	4/15 (26.67%)	1/15 (6.67%)	/	/	2/15 (13.33%)	8/15 (53.33%)	7/15 (46.67%)
≥50 god	2/19 (10.53%)	12/19 (63.16%)	/	/	/	5/19 (26.32%)	14/19 (73.68%)
UKUPNO	38/179 (21.23%)	38/179 (21.23%)	2/179 (1.12%)	/	20/179 (11.17%)	81/179 (45.25%)	98/179 (54.75%)

broj pozitivnih/broj ispitanih

% pozitivnih

* udružene infekcije sa dva virusa

U tabeli 13 vidi se da je u 2014. godini, na uzorku od 197 pregledanih osoba sa gastrointestinalnim sindromom, broj akutnih infekcija rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima, bio 128 (64,97%). U 2014. godini nisu u uzorcima stolice dokazane udružene infekcije sa dva virusa.

Tabela 13. Učestalost akutnih infekcija izazvanih rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima u 2014. godini

STAROST	ROTA	NORO	ASTRO	2* VIRUSA	ADENO	UKUPNO	
						NEGATIVNI	POZITIVNI
0-5 god	38/116 (32.76%)	14/116 (12.07%)	4/116 (3.45%)	/	36/116 (31.03%)	24/116 (20.69%)	92/116 (79.31%)
6-14 god	5/16 (31.25%)	3/16 (18.75%)	/	/	3/16 (18.75%)	5/16 (31.25%)	11/16 (68.75%)
15-19 god	4/16 (25.0%)	2/16 (12.5%)	/	/	/	10/16 (62.5%)	6/16 (37.5%)
20-29 god	1/14 (7.14%)	5/14 (35.71%)	/	/	/	8/14 (57.14%)	6/14 (42.86%)
30-49 god	/	6/18 (33.33%)	/	/	1/18 (5.56%)	11/18 (61.11%)	7/18 (38.89%)
≥50 god	/	6/17 (35.29%)	/	/	/	11/17 (64.71%)	6/17 (35.29%)
UKUPNO	48/197 (24.37%)	36/197 (18.27%)	4/197 (2.03%)	/	40/197 (20.30%)	69/197 (35.03%)	128/197 (64.97%)

broj pozitivnih/broj ispitanih

% pozitivnih

* udružene infekcije sa dva virusa

Tabela 14 prikazuje rezultate pregleda 285 osoba sa dijarealnim sindromom u 2015. godini. Dokazano je 243 (85,26%) akutno obolelih od rota, noro, astro ili enteričnih adenovirusa. U 2015. godini kod 15 pregledanih osoba (5,26%) u uzorcima stolice dokazana su dva virusa i to češće kod dece.

U tabeli 15 prikazani su rezultati pregleda 242 obolele osobe u 2016. godini. Ukupan broj pozitivnih na rota, noro, astro i enterične adenoviruse bio je 172 (71,07%) u odnosu na 242 pregledane osobe. U 2016. godini u uzorcima stolice 2 virusa (udružena infekcija) su utvrđena kod 12 pregledanih osoba (4,96%). Pozitivnih na dva virusa bilo je u sasvim malom broju u svim starosnim grupama.

Tabela 14. Učestalost akutnih infekcija izazvanih rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima u 2015. godini

STAROST	ROTA	NORO	ASTRO	2* VIRUSA	ADENO	UKUPNO	
						NEGATIVNI	POZITIVNI
0-5 god	69/136 (50.74%)	26/136 (19.12%)	5/136 (3.68%)	8/136 (5.88%)	19/136 (13.97%)	9/136 (6.62%)	127/136 (93.38%)
6-14 god	14/45 (31.11%)	13/45 (28.89%)	5/45 (11.11%)	3/45 (6.67%)	7/45 (15.56%)	3/45 (6.67%)	42/45 (93.33%)
15-19 god	4/11 (36.36%)	6/11 (54.55%)	/	/	/	1/11 (9.09%)	10/11 (90.91%)
20-29 god	9/26 (34.62%)	10/26 (38.46%)	/	/	5/26 (19.23%)	2/26 (7.69%)	24/26 (92.31%)
30-49 god	8/30 (26.67%)	6/30 (20.0%)	/	2/30 (6.67%)	4/30 (13.33%)	10/30 (33.33%)	20/30 (66.67%)
≥50 god	12/37 (32.43%)	4/37 (10.81%)	1/37 (2.70%)	2/37 (5.41%)	1/37 (2.70%)	17/37 (45.95%)	20/37 (54.05%)
UKUPNO	116/285 (40.70%)	65/285 (22.81%)	11/285 (3.86%)	15/285 (5.26%)	36/285 (12.63%)	42/285 (14.74%)	243/285 (85.26%)

broj pozitivnih/broj ispitanih

% pozitivnih

* udružene infekcije sa dva virusa

Tabela 15. Učestalost akutnih infekcija izazvanih rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima u 2016. godini

STAROST	ROTA	NORO	ASTRO	2* VIRUSA	ADENO	UKUPNO	
						NEGATIVNI	POZITIVNI
0-5 god	33/76 (43.42%)	3/76 (3.95%)	/	1/76 (1.32%)	11/76 (14.47%)	28/76 (36.84%)	48/76 (63.16%)
6-14 god	10/48 (20.83%)	14/48 (29.17%)	2/48 (4.17%)	2/48 (4.17%)	7/48 (14.58%)	13/48 (27.08%)	35/48 (72.92%)
15-19 god	1/13 (7.69%)	2/13 (15.38%)	/	2/13 (15.38%)	3/13 (23.08%)	5/13 (38.46%)	8/13 (61.54%)
20-29 god	4/35 (11.43%)	18/35 (51.43%)	/	2/35 (5.71%)	3/35 (8.57%)	8/35 (22.86%)	27/35 (77.14%)
30-49 god	4/32 (12.5%)	16/32 (50.0%)	/	3/32 (9.38%)	2/32 (6.25%)	7/32 (21.88%)	25/32 (78.12%)
≥50 god	6/38 (15.79%)	19/38 (50.0%)	/	2/38 (5.26%)	2/38 (5.26%)	9/38 (23.68%)	29/38 (76.32%)
UKUPNO	58/242 (23.97%)	72/242 (29.75%)	2/242 (0.83%)	12/242 (4.96%)	28/242 (11.57%)	70/242 (28.93%)	172/242 (71.07%)

broj pozitivnih/broj ispitanih

% pozitivnih

* udružene infekcije sa dva virusa

Tabela 16 prikazuje rezultate pregleda uzoraka stolice *real-time PCR* testom u petogodišnjem periodu na ukupnom uzorku 1003 obolele osobe. Vidi se da je u petogodišnjem periodu akutna infekcija izazvana rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima dokazana u 709 bolesnika (70,69%).

Tabela 16. Učestalost akutnih infekcija izazvanih rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima u petogodišnjem periodu (2012-2016. god.)

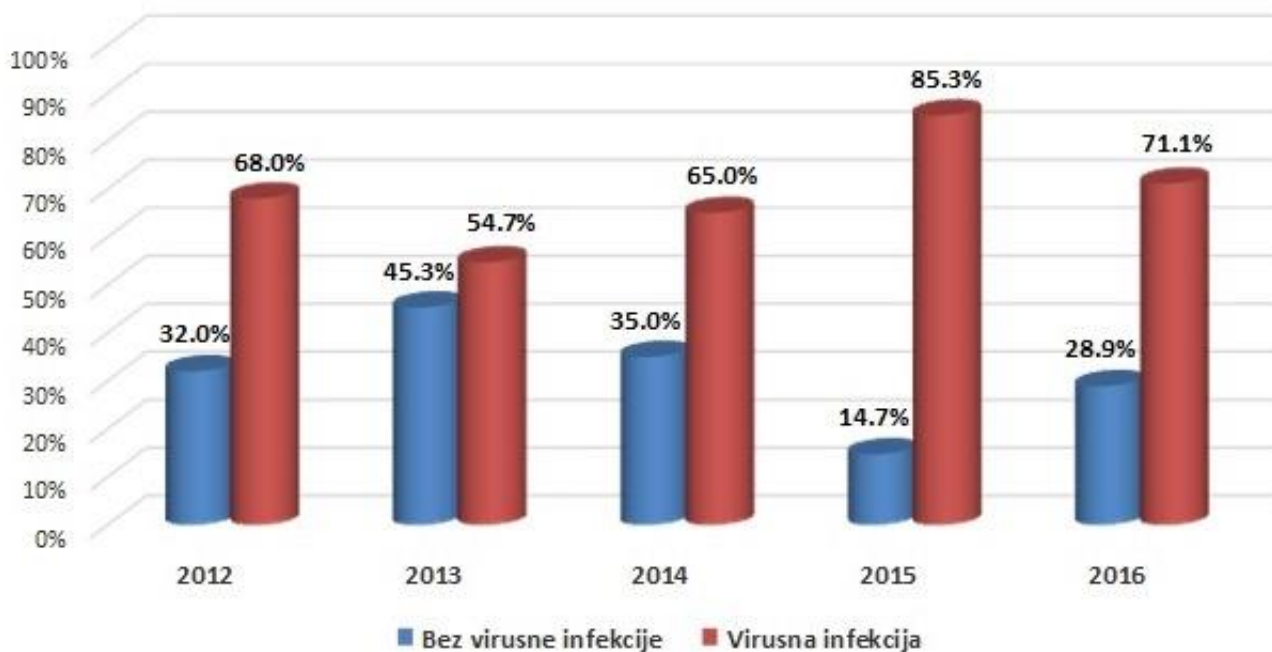
STAROST	ROTA	NORO	ASTRO	2* VIRUSA	ADENO	UKUPNO	
						NEGATIVNI	POZITIVNI
0-5 god	191/491 (38.90%)	69/491 (14.05%)	12/491 (2.44%)	11/491 (2.24%)	82/491 (16.70%)	126/491 (25.66%)	365/491 (74.34%)
6-14 god	36/145 (24.83%)	35/145 (24.14%)	10/145 (6.90%)	7/145 (4.83%)	25/145 (17.24%)	32/145 (22.07%)	113/145 (77.93%)
15-19 god	10/64 (15.63%)	16/64 (25.0%)	/	3/64 (4.69%)	6/64 (9.38%)	29/64 (45.31%)	35/64 (54.69%)
20-29 god	15/93 (16.13%)	39/93 (41.94%)	/	2/93 (2.15%)	9/93 (9.68%)	28/93 (30.11%)	65/93 (69.89%)
30-49 god	16/98 (16.33%)	31/98 (31.63%)	/	5/98 (5.10%)	9/98 (9.18%)	37/98 (37.76%)	61/98 (62.24%)
≥50 god	21/112 (18.75%)	41/112 (36.61%)	1/112 (0.89%)	4/112 (3.57%)	3/112 (2.68%)	42/112 (37.5%)	70/112 (62.5%)
UKUPNO	289/1003 (28.81%)	231/1003 (23.03%)	23/1003 (2.29%)	32/1003 (3.19%)	134/1003 (13.36%)	194/1003 (29.31%)	709/1003 (70.69%)

broj pozitivnih/broj ispitanih

% pozitivnih

* udružene infekcije sa dva virusa

Rezultatima pregleda *real-time PCR* testom, prikazanim za svaku godinu ispitivanja, kao i analiziranjem celokupnog uzorka (tabela 16), utvrđeno je da su infekcije virusima koji su bili predmet istraživanja bile prisutne u značajnom procentu u svim starosnim grupama i to svake godine ovog istraživanja. Najviše infekcija bilo je kod male dece (uzrasta do 5 godina) i školske dece (uzrasta 6 do 14 godina), ali i kod osoba starih 50 i više godina, kao i u svim ostalim starosnim grupama. Vidi se da je najviše infekcija ovim virusnim uzročnicima gastroenterokolitisa bilo 2015. godine (85,26%, tabela 14). U 2016. godini procenat obolelih osoba od virusnog gastroenterokolitisa bio je 71,07%, u 2012. godini 68,0%, procenat pozitivnih 2013. godine bio je 54,75%, a 2014. godine 64,97%. Prema tome, statistički značajno najviše virusnih uzročnika dijarealnog sindroma je dokazano 2015. godine u odnosu na ostale godine istraživanja, kada se analizira celokupni uzorak (1003 pregledane osobe u periodu od 5 godina), pri čemu je kod 709 obolelih dokazan neki od virusnih uzročnika ($\chi^2=54,638$; $p=0,000$, grafikon 1).

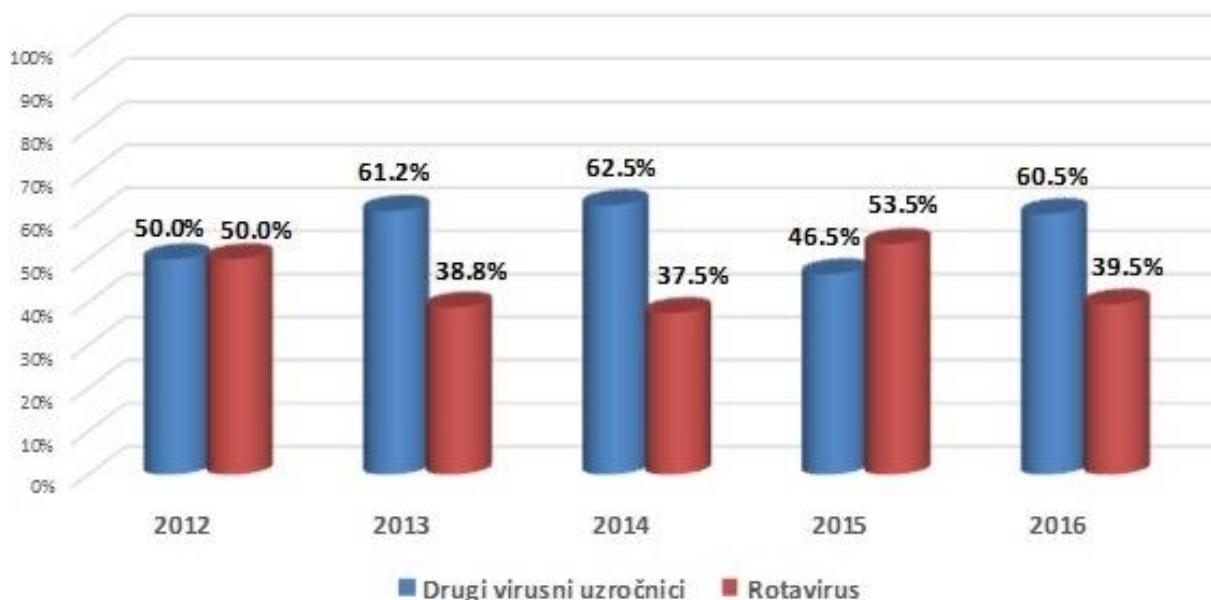


Grafikon 1. Procenat dokazanih virusnih infekcija kod pojave akutnog dijarealnog sindroma prema godinama istraživanja

U tabeli 16 gde su prikazani rezultati pregleda 1003 bolesnika sa znacima akutnog dijarealnog sindroma različite starosti, rotavirusna infekcija je dokazana kod 289 obolelih (28,81%). Norovirusna infekcija je utvrđena kod 231 osobe sa akutnim dijarealnim sindromom (23,03%), a astrovirusna infekcija je dokazana kod 23 obolele osobe (2,29%). Akutne infekcije enteričnim adenovirusima kod obolelih od akutnog dijarealnog sindroma dokazane su kod 134 osobe (13,36%). Udružena infekcija sa dva virusa nađena je u uzorcima stolice kod 32 pregledane osobe (3,19%). Činjenica da su virusne infekcije izazvane rota, noro, astro, kao i enteričnim adenovirusima dokazane *real-time PCR* testom u 70,69% obolelih od akutnog dijarealnog sindroma i to u svim starosnim grupama pregledanih osoba, potvrđuje značaj i neophodnost sprovođenja ove dijagnostike u redovnom radu.

Rotavirusna infekcija, utvrđena u 28,81% pregledanih na ukupnom uzorku, bila je dokazana 2012. godine u 29,0% ispitanih osoba, 2013. godine u 21,23%, 2014. godine u 24,37%, 2015. godine u 40,70%, a 2016. godine u 23,97% obolelih. Statistički značajno više pacijenata zaraženih rotavirusom bilo je 2015. godine, u odnosu na ostale godine ispitivanja, ako se analizira ceo uzorak (pozitivni na rotavirus u odnosu na ostale – pozitivne na druge viruse i negativne) ($\chi^2=41,134$, $p=0,000$). Isto tako, kada se analiziraju samo uzorci stolice, koji su bili pozitivni na virusne uzročnike (uzorci 709 obolelih), statistički značajno više pacijenata zaraženih rotavirusom u odnosu na obolele zaražene nekim drugim virusom bilo je 2015. godine, nego ostalih godina istraživanja

($\chi^2=14,298$, $p=0,006$; grafikon 2). U pozitivne na rotavirus ubrojani su i oboleli kod kojih su dokazane udružene infekcije sa dva virusa od kojih je jedan bio rotavirus. Takvih bolesnika je bilo u 5 u 2012. godini, 14 u 2015. godini i 10 u 2016. godini. U 2013. i 2014. godini nije bilo udruženih infekcija.

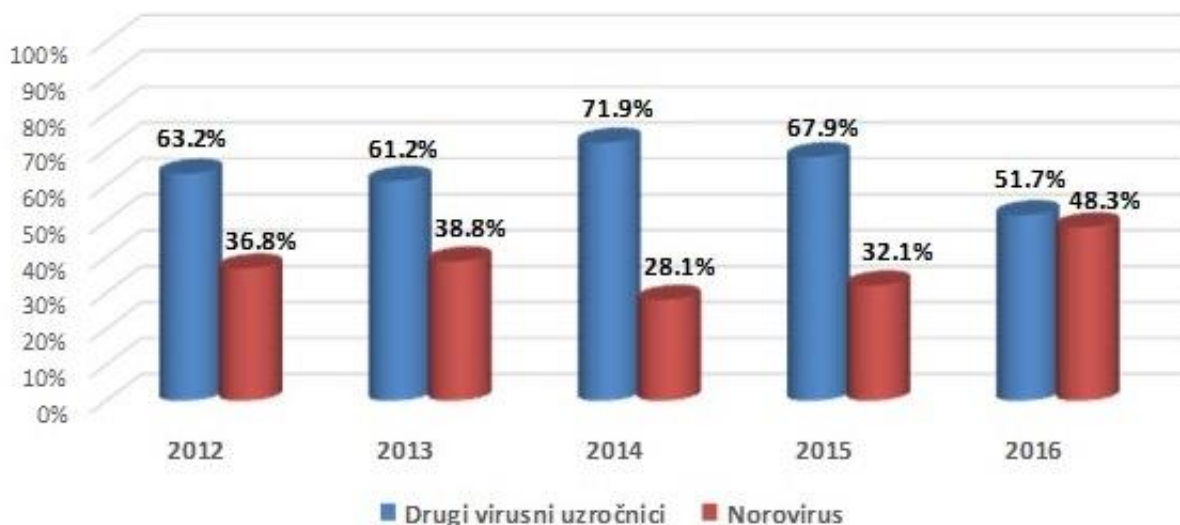


Grafikon 2. Procenat dokazanih rotavirusnih infekcija prema godinama istraživanja u odnosu na sve druge dokazane virusne uzročnike

U tabeli 16 vidi se da je akutna infekcija norovirusom na ukupnom uzorku pregledanih osoba (1003 obolelih) dokazana u 23,03% slučajeva. Najviše norovirusnih infekcija bilo je 2016. godine (29,75%). Visok procenat ovih infekcija dokazan je i 2015. godine (22,81%), 2013. godine (21,23%), 2012. godine (20,0%) i 2014. godine (18,27%).

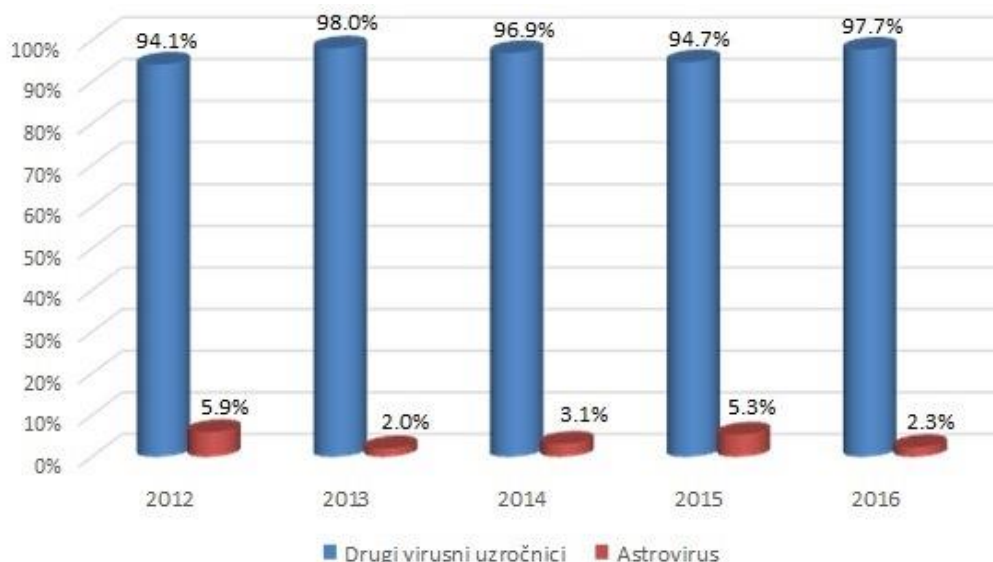
Procenat pozitivnih na norovirus u svakoj godini ovog ispitivanja bio je dosta ujednačen, a 2016. godine taj procenat dokazanih infekcija norovirusom bio je najveći, mada to nije bilo statistički značajno veće u odnosu na druge godine istraživanja. Statistički značajno manje norovirusnih infekcija bilo je 2014. godine u odnosu na ostale godine ovog istraživanja, ako se analizira ceo uzorak (pozitivni na norovirus u odnosu na ostale – pozitivne na druge viruse i negativne) ($\chi^2=17,249$; $p=0,002$). U pozitivne na norovirus ubrojani su i oboleli kod kojih su dokazane udružene infekcije sa dva virusa od kojih je jedan bio norovirus. Takvih bolesnika je bilo u 2012. godini 5, u 2015. godini 13, a u 2016. godini 11. U 2013. i 2014. godini nije bilo udruženih infekcija. Takođe, kada se analiziraju samo uzorci stolice, koji su bili pozitivni na virusne uzročnike (uzorci 709 obolelih), 2014. godine bilo je statistički značajno manje norovirusnih infekcija u

odnosu na infekcije drugim virusima tokom ostalih godina ovog istraživanja ($\chi^2=16,340$; $p=0,003$, grafikon 3).



Grafikon 3. Procenat dokazanih norovirusnih infekcija prema godinama istraživanja u odnosu na sve druge dokazane virusne uzročnike

Astrovirusna infekcija je dokazana kod znatno manjeg broja obolelih u odnosu na infekcije rota i norovirusima. Na ukupnom uzorku dokazana je u 23 osobe (2,29% pregledanih). Ovaj virus je potvrđen kao uzročnik gastroenterokolitisa samo kod dece i to starosti 6 do 14 godina (u 6,90%) i dece uzrasta do 5 godina (u 2,44%) na ukupnom uzorku 1003 pregledane osobe, obolele od dijarealnog sindroma. Najviše ovih infekcija dokazano je 2015. godine kod dece stare 6 do 14 godina u 11,11% slučajeva. Na celokupnom uzorku samo jedna osoba stara 50 godina imala je dijagnostikovanu astrovirusnu infekciju. U ostalim starosnim grupama nije bilo obolelih od astrovirusa. Zbog relativno malog broja pozitivnih, nije mogla da se uradi validna statistička analiza. Na grafikonu 4 prikazan je procenat astrovirusnih infekcija prema godinama istraživanja u odnosu na obolele, pozitivne na druge virusne uzročnike (uzorci 709 obolelih). U pozitivne na astrovirus ubrojani su i oboleli kod kojih su dokazane udružene infekcije sa dva virusa, od kojih je jedan bio astrovirus. Takvih bolesnika bilo je dvoje u 2015. godini i dvoje u 2016. godini.



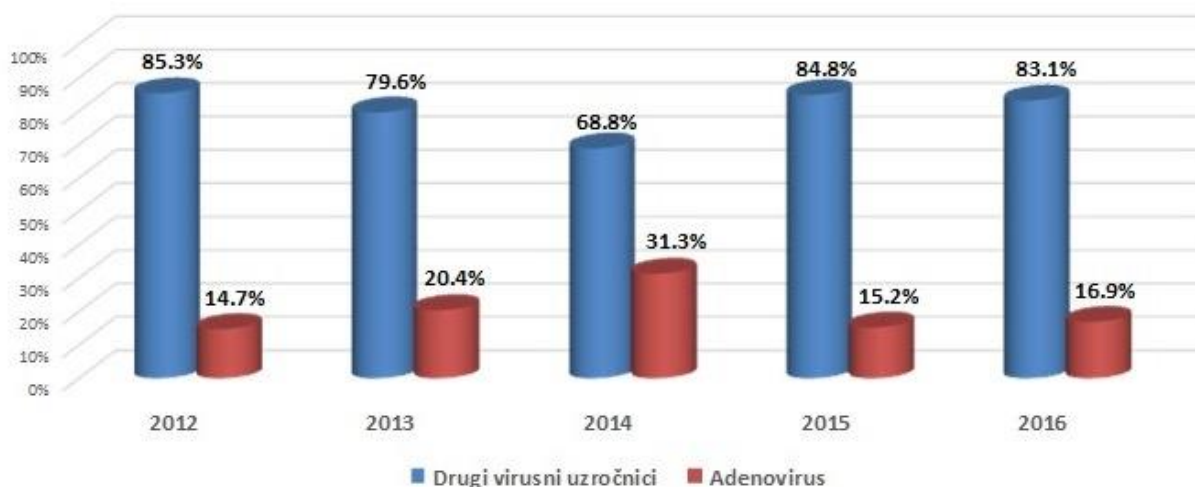
Grafikon 4. Procenat dokazanih astrovirusnih infekcija prema godinama istraživanja u odnosu na sve druge dokazane virusne uzročnike

Dva virusa u uzorcima stolice dokazana su kod 32 bolesnika (3,19%) na ukupnom uzorku od 1003 obolele osobe sa dijarealnim sindromom. Pri tome, u 2013. i 2014. godini nisu u uzorcima stolice dokazane udružene infekcije sa dva virusa. Po dva virusa su bila dokazana uglavnom u slučajevima upućivanja na dijagnostički pregled zbog epidemioloških indicacija (konstatovane bolesti u kolektivu ili porodici). Zbog relativno malog broja pozitivnih, nije mogla da se uradi validna statistička analiza.

U tabeli 16 vidi se da je na uzorku od 1003 pregledane osobe sa dijarealnim sindromom, akutna infekcija enteričnim adenovirusima dokazana u 134 bolesnika (13,36%). Obolelih je bilo u svim starosnim grupama, najmanje kod osoba starih 50 i više od 50 godina (u 2,68%), a najviše kod obolele dece, uzrasta 6 do 14 godina (u 17,24%) i dece uzrasta do 5 godina (u 16,70%).

Procenat pozitivnih na enterične adenoviruse po godinama ovog istraživanja bio je ujednačen. U 2012. godini utvrđeno je 10% adeno-pozitivnih bolesnika sa dijarealnim sindromom, u 2013. godini 11,17%, u 2015. godini 12,63%, u 2016. godini 11,57%, dok je najviše adeno-pozitivnih bilo 2014. godine 20,30%. Infekcije enteričnim adenovirusima bile su najčešće kod dece stare 6 do 14 godina i uzrasta do 5 godina, a 2013. i posebno 2016. godine i kod dece stare 15 do 19 godina (23,08% u 2016. godini). Statistički značajno više pacijenata zaraženih adenovirusom bilo je 2014. godine u odnosu na ostale godine ispitivanja, ako se analizira ceo uzorak (pozitivni na adenovirus u odnosu na ostale – pozitivne na druge viruse i negativne) ($\chi^2=10,191$; $p=0,037$). Isto tako, statistički značajno više obolelih od adenovirusa u odnosu na obolele od drugih virusa tokom ovog istraživanja bilo je 2014. godine ($\chi^2=16,049$; $p=0,003$, grafikon 5). U pozitivne na adenovirus ubrojani su i oboleli kod kojih su dokazane udružene infekcije sa dva virusa od kojih je jedan bio

adenovirus. Takvih bolesnika je bilo u 2015. godini 1 i u 2016. godini 1. U 2012., 2013. i 2014. godini nije bilo udruženih infekcija sa adenovirusom.



Grafikon 5. Procenat dokazanih adenovirusnih infekcija prema godinama istraživanja u odnosu na sve druge dokazane virusne uzročnike

Da bi se detaljnije moglo analizirati prisustvo virusa, koji su bili predmet ovog istraživanja, prema godinama u kojima je istraživanje rađeno (2012-2016. god.), kao i prema starosnim grupama obolelih, prikazane su tabela 17 za rotaviruse, tabela 18 za noroviruse, tabela 19 za astroviruse, tabela 20 za adenoviruse i tabela 21 za istovremeno dokazana dva virusa u uzorku stolice (udružene infekcije).

U tabeli 17, koja prikazuje učestalost rotavirusnih infekcija po godinama u kojima je vršeno istraživanje, kao i u odnosu na starost obolelih, vidi se da je značajan procenat rotavirusnih infekcija utvrđen svake godine tokom trajanja ovog istraživanja (najviše 2015. godine). U svakoj godini istraživanja rotavirusnih infekcija, značajno najviše obolelih bilo je kod dece uzrasta do 5 godina. Isto tako, na ukupnom petogodišnjem uzorku, rotavirusna infekcija je statistički značajno najčešće utvrđena kod dece uzrasta do 5 godina u 38,90% ($\chi^2=41,737$; $p=0,000$). Kod dece uzrasta 6 do 14 godina procenat rota-pozitivnih bio je isto visok (24,83%) u odnosu na ostale starosne grupe obolelih. Prema tome, kod dece uzrasta do 5 godina i 6 do 14 godina infekcije rotavirusom bile su značajno češće utvrđene u odnosu na ostale starosne grupe, kada se ima u vidu celokupni uzorak. Rotavirusne infekcije su utvrđene u svim starosnim grupama, odnosno, i kod osoba starih više od 15 godina (15 do 19 godina u 15,63%, zatim 20 do 29 godina u 16,13%, kod odraslih starih 30 do 49 godina u 16,33% i kod starih 50 i preko 50 godina u 18,75%). Kod bolesnika starih 50 i više od 50

godina procenat pozitivnih na rotavirus (18,75%) nešto je veći nego kod ostalih odraslih bolesnika, ali ta razlika nije statistički značajna. Tinejdžeri, stari 15 do 19 godina, imali su rotavirusne infekcije u najvećem broju 2015. godine (36,36% slučajeva). Godine 2015. i u svim ostalim starosnim grupama odraslih osoba procenat pozitivnih na rotaviruse bio je veći nego u drugim godinama ovog istraživanja (kod starih 20 do 29 godina – 34,62%, 30 do 49 godina – 26,67%, 50 i više godina - 32,43%). To važi i za obolelu decu (kod dece do 5 godina – 50,74% i 6 do 14 godina – 31,11%).

Tabela 17. Učestalost rotavirusnih infekcija po godinama ispitivanja

STAROST	2012	2013	2014	2015	2016	UKUPNO (2012-2016.)
0-5 god	27/72 (37.5%)	24/91 (26.37%)	38/116 (32.76%)	69/136 (50.74%)	33/76 (43.42%)	191/491 (38.90%)
6-14 god	1/15 (6.67%)	6/21 (28.57%)	5/16 (31.25%)	14/45 (31.11%)	10/48 (20.83%)	36/145 (24.83%)
15-19 god	/	1/18 (5.56%)	4/16 (25.0%)	4/11 (36.36%)	1/13 (7.69%)	10/64 (15.63%)
20-29 god	/	1/15 (6.67%)	1/14 (7.14%)	9/26 (34.62%)	4/35 (11.43%)	15/93 (16.13%)
30-49 god	/	4/15 (26.67%)	/	8/30 (26.67%)	4/32 (12.5%)	16/98 (16.33%)
≥50 god	1/1 (100.0%)	2/19 (10.53%)	/	12/37 (32.43%)	6/38 (15.79%)	21/112 (18.75%)
UKUPNO	29/100 (29.0%)	38/179 (21.23%)	48/197 (24.37%)	116/285 (40.70%)	58/242 (23.97%)	289/1003 (28.81%)

broj pozitivnih/broj ispitanih
% pozitivnih

Tabela 18. Učestalost norovirusnih infekcija po godinama ispitivanja

STAROST	2012	2013	2014	2015	2016	UKUPNO (2012-2016.)
0-5 god	11/72 (15.28%)	15/91 (16.48%)	14/116 (12.07%)	26/136 (19.12%)	3/76 (3.95%)	69/491 (14.05%)
6-14 god	4/15 (26.67%)	1/21 (4.76%)	3/16 (18.75%)	13/45 (28.89%)	14/48 (29.17%)	35/145 (24.14%)
15-19 god	1/6 (16.67%)	5/18 (27.78%)	2/16 (12.5%)	6/11 (54.55%)	2/13 (15.38%)	16/64 (25.0%)
20-29 god	2/3 (66.67%)	4/15 (26.67%)	5/14 (35.71%)	10/26 (38.46%)	18/35 (51.43%)	39/93 (41.94%)
30-49 god	2/3 (66.67%)	1/15 (6.67%)	6/18 (33.33%)	6/30 (20.0%)	16/32 (50.0%)	31/98 (31.63%)
≥50 god	/	12/19 (63.16%)	6/17 (35.29%)	4/37 (10.81%)	19/38 (50.0%)	41/112 (36.61%)
UKUPNO	20/100 (20.0%)	38/179 (21.23%)	36/197 (18.27%)	65/285 (22.81%)	72/242 (29.75%)	231/1003 (23.03%)

broj pozitivnih/broj ispitanih
% pozitivnih

U tabeli 18, koja prikazuje broj i procenat pozitivnih osoba na norovirus prema godinama istraživanja i prema starosti obolelih, vidi se da je na uzorku od 1003 pregledana bolesnika u petogodišnjem periodu bila 231 osoba pozitivna na norovirus (23,03%). Procenat pozitivnih na norovirus u svakoj godini ovog ispitivanja bio je dosta ujednačen (2012. godine – 20,0%, 2013. godine – 21,23%, 2014. godine – 18,27%, 2015. godine – 22,81%), a 2016. godine procenat dokazanih infekcija norovirusom bio je nešto veći – 29,75%, ali to nije bilo statistički značajno. Infekcije norovirusom tokom petogodišnjeg istraživanja bile su najređe kod dece do 5 godina – dokazane su u 14,05%. Kod dece uzrasta 6 do 14 godina norovirusna infekcija je utvrđena u 24,14%, a kod tinejdžera starih 15 do 19 godina u 25,0% obolelih sa znacima akutne dijarealne bolesti. Kod osoba starijih od 20 godina, norovirus je u uzorcima stolice dokazan u statistički značajno većem procentu nego kod dece i tinejdžera ($\chi^2=60,445$; $p=0,000$). Kod obolelih starih 20 do 29 godina procenat pozitivnih na norovirus bio je 41,94%, kod odraslih osoba starih 30 do 49 godina – 31,63%, a kod bolesnika starih 50 i više godina – 36,61%. Najviše norovirusnih infekcija kod osoba starih 50 i više godina bilo je 2013. godina (63,16%) i 2016. godine (50,0%), dok je tokom 2014. godine utvrđeno 35,29% obolelih, a 2015. godine 10,81%. Norovirusne infekcije kod najstarijih obolelih osoba nisu dijagnostikovane 2012. godine. Godine 2016. utvrđeno je više pozitivnih na norovirus kod bolesnika starih 20 do 29 godina (51,43%) i starih 30 do 49 godina (50,0%). Više norovirusnih infekcija bilo je kod nešto mlađih osoba u 2012. godini, a najviše kod bolesnika starosti 20 do 29 godina (66,67%) i 30 do 49 godina (66,67%). Ove razlike nisu

statističke značajne, ali ukazuju na značajnu ulogu norovirusa u nastanku dijarealnog sindroma, posebno kod odraslih i kod starih osoba (starih 50 i više godina).

Tabela 19. Učestalost astrovirusnih infekcija po godinama ispitivanja

STAROST	2012	2013	2014	2015	2016	UKUPNO (2012-2016.)
0-5 god	1/72 (1.39%)	2/91 (2.20%)	4/116 (3.45%)	5/136 (3.68%)	/	12/491 (2.44%)
6-14 god	3/15 (20.0%)	/	/	5/45 (11.11%)	2/48 (4.17%)	10/145 (6.90%)
15-19 god	/	/	/	/	/	/
20-29 god	/	/	/	/	/	/
30-49 god	/	/	/	/	/	/
≥50 god	/	/	/	1/37 (2.70%)	/	1/112 (0.89%)
UKUPNO	4/100 (4.0%)	2/179 (1.12%)	4/197 (2.03%)	11/285 (3.86%)	2/242 (0.83%)	23/1003 (2.29%)

broj pozitivnih/broj ispitanih
% pozitivnih

U tabeli 19, gde je prikazana učestalost astrovirusnih infekcija prema godinama istraživanja i prema starosti obolelih osoba, vidi se da je infekcija astrovirusom dokazana kod 23 bolesnika od 1003 pregledane osobe (samo u 2,29%). Malo više obolelih bilo je 2015. godine (3,86%) u odnosu na ostale godine. Akutne infekcije astrovirusom dokazane samo kod dece i to uzrasta do 5 godina u 2,44% (kod 12 dece) i kod dece stare 6 do 14 godina u 6,90% (kod 10 obolelih). Osim jednog bolesnika, starog 50 godina, u ostalim starosnim grupama (15 do 19 godina, 20 do 29 godina i 30 do 49 godina) nije dokazan nijedan slučaj akutne astrovirusne infekcije. Kod četvero obolelih dokazane su udružene infekcije sa dva virusa od kojih je jedan bio astrovirus (dvoje u 2015. i dvoje u 2016. godini).

Tabela 20. Učestalost adenovirusnih infekcija po godinama ispitivanja

STAROST	2012	2013	2014	2015	2016	UKUPNO (2012-2016.)
0-5 god	6/72 (8.33%)	10/91 (10.99%)	36/116 (31.03%)	19/136 (13.97%)	11/76 (14.47%)	82/491 (16.70%)
6-14 god	4/15 (26.67%)	4/21 (19.05%)	3/16 (18.75%)	7/45 (15.56%)	7/48 (14.58%)	25/145 (17.24%)
15-19 god	/	3/18 (16.67%)	/	/	3/13 (23.08%)	6/64 (9.38%)
20-29 god	/	1/15 (6.67%)	/	5/26 (19.23%)	3/35 (8.57%)	9/93 (9.68%)
30-49 god	/	2/15 (13.33%)	1/18 (5.56%)	4/30 (13.33%)	2/32 (6.25%)	9/98 (9.18%)
≥50 god	/	/	/	1/37 (2.70%)	2/38 (5.26%)	3/112 (2.68%)
UKUPNO	10/100 (10.0%)	20/179 (11.17%)	40/197 (20.30%)	36/285 (12.63%)	28/242 (11.57%)	134/1003 (13.36%)

broj pozitivnih/broj ispitanih
% pozitivnih

U tabeli 20 prikazani su rezultati pregleda na enterične adenoviruse prema godinama ovog istraživanja i prema starosti pregledanih osoba. U petogodišnjem periodu enterični adenovirusi dokazani su kod 134 obolele osobe (13,36%). Statistički značajno najviše obolelih od enteričnih adenovirusa bilo je 2014. godine (20,30%, $\chi^2=10,191$; $p=0,037$), dok je u ostalim godinama bio prilično ujednačen procenat obolelih. Obolelih je bilo uglavnom u svim starosnim grupama kod pregledanih osoba sa dijarealnim sindromom. Ako se analizira celokupan uzorak od 1003 obolele osobe, najviše obolelih od enteričnih adenovirusa bilo je kod dece stare 6 do 14 godina (u 17,24%) i kod dece do 5 godina (u 16,70%). Dakle, statistički značajno najčešće su enterični adenovirusi dokazani kod dece (uzrasta do 5 godina i 6 do 14 godina zajedno, $\chi^2=22,018$; $p=0,001$). Najmanje ih je bilo kod osoba starih 50 i više od 50 godina kod 2,68%.

Tabela 21. Učestalost udruženih infekcija (2 uzročnika u istom uzorku) po godinama ispitivanja

STAROST	2012	2015	2016	UKUPNO (2012-2016.)
0-5 god	2/72 (2.78%)	8/136 (5.88%)	1/76 (1.32%)	11/491 (2.24%)
6-14 god	2/15 (13.33%)	3/45 (6.67%)	2/48 (4.17%)	7/145 (4.83%)
15-19 god	1/6 (16.67%)	/	2/13 (15.38%)	3/64 (4.69%)
20-29 god	/	/	2/35 (5.71%)	2/93 (2.15%)
30-49 god	/	2/30 (6.67%)	3/32 (9.38%)	5/98 (5.10%)
≥50 god	/	2/37 (5.41%)	2/38 (5.26%)	4/112 (3.57%)
UKUPNO	5/100 (5.0%)	15/285 (5.26%)	12/242 (4.96%)	32/1003 (3.19%)

broj pozitivnih/broj ispitanih
% pozitivnih

U tabeli 21 prikazan je broj i procenat pozitivnih osoba na dva virusa, dokazana u uzorcima stolice. Podaci su grupisani u odnosu na godine ovog istraživanja i u odnosu na starost pregledanih osoba sa znacima akutnog gastroenterokolitisa. Na ukupnom uzorku 1003 pregledane osobe sa dijarealnim sindromom kod 32 bolesnika (3,19%) utvrđeno je u stolici prisustvo 2 virusa (udružena infekcija). Godine 2013. i 2014. ni u jednom uzorku stolice nisu dokazana 2 virusa. U 2012. godini su u pet uzoraka stolice (5,0%) bila dokazana po 2 virusa i to rota i norovirusi u svih pet obolelih. Radilo se o dvoje dece uzrasta do 5 godina, dvoje dece stare 6 do 14 godina i jedne obolele osobe stare 15 do 19 godina. Godine 2015. bilo je najviše udruženih infekcija. Dokazane su u stolici kod 15 bolesnika (5,26%). Od ovih 15 bolesnika, njih 12 su imali u uzorcima stolice rota i noroviruse, jedna osoba je imala rota i adenoviruse, jedan bolesnik noro i astroviruse i jedna obolela osoba rota i astroviruse u stolici. Pri tome, 8 bolesnika su bila deca uzrasta do 5 godina, troje obolele dece je bilo staro 6 do 14 godina, a po dva bolesnika su bila iz starosne grupe 30 do 49 godina i 50 i više od 50 godina. U 2016. godini 12 osoba je bilo sa dokazana 2 virusa u stolici (4,96%). Njih 9 je imalo dokazane rota i noroviruse u uzorku stolice, dva bolesnika su imala noro i astroviruse u pregledanom uzorku, a jedna osoba je imala rota i adenoviruse u stolici. Dva virusa u stolici dokazana su kod jednog deteta starog do 5 godina, dvoje dece stare 6 do 14 godina, dva tinejdžera stara 15 do 19 godina, zatim kod dva bolesnika stara 20 do 29 godina, kod tri osobe stare 30 do 49 godina i kod dva bolesnika stara 50 i više godina. Na tabeli 21 vidi se da je procenat bolesnika sa

dva virusa, potvrđena u uzorku stolice, bio ujednačen po godinama ovog istraživanja, odnosno, u godinama u kojima su dokazane udružene infekcije (2012. godine 5,0%, 2015. godine 5,26% i 2016. godine 4,96%). Nije bilo značajnih razlika ni u odnosu na starosne grupe osoba kod kojih su dokazana dva virusa u stolici.

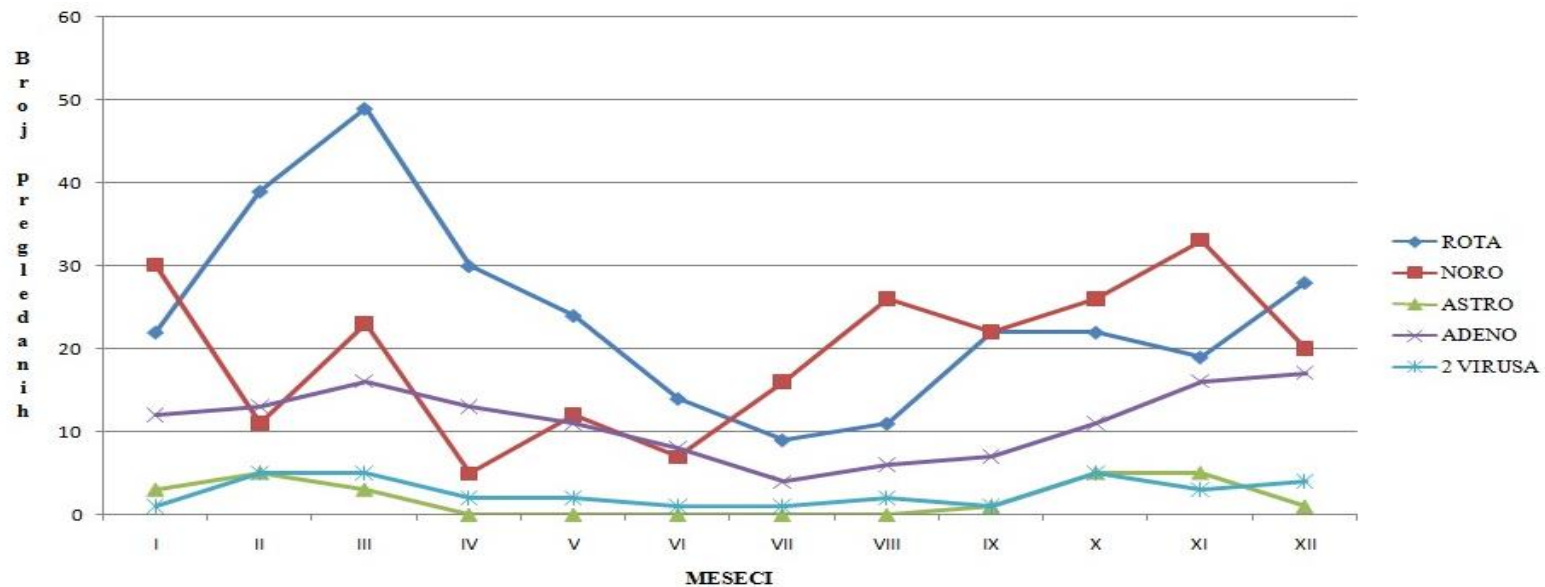
6.2. Učestalost javljanja dijarealnog sindroma tokom godine (po mesecima)

U tabelama 22A i 22B prikazano je po mesecima u godini javljanje akutnih infekcija izazvanih virusima koji su bili predmet ovog istraživanja (rota, noro, astro i adeno) i to na celokupnom uzorku. Rotavirusna infekcija je bila najčešće utvrđena zimi i u rano proleće (u decembru, februaru, martu i aprilu). Norovirusna infekcija je najčešće dijagnostikovana u avgustu, septembru, oktobru, novembru, januaru i martu. Astrovirusna infekcija se najčešće javljala u oktobru, novembru, januaru, februaru i martu, a adenovirusna infekcija u novembru, decembru, februaru, martu i aprilu. Udružena infekcija sa dva virusa najčešće je dijagnostikovana u oktobru, novembru, decembru, februaru i martu (tabela 22A). Iako su se navedene virusne infekcije češće javljale u određenim mesecima, bile su prisutne tokom čitave godine (tabele 22A i 22B).

Kada se u tabeli 22B analizira javljanje svih ovih virusnih infekcija zajedno na ukupnom uzorku i to po mesecima u godini, vidi se da su rota, noro, astro i adenovirusne infekcije bile najčešće krajem jeseni, zimi i u rano proleće (oktobar, novembar, decembar, januar, februar i mart). Potvrđeno je češće javljanje ovih virusnih infekcija u hladnom – zimskom periodu godine, što je poznato za regione sa umerenom klimom. Međutim, infekcije rota, noro, astro i adenovirusom utvrđene su i tokom čitave godine.

Tabela 22A. Učestalost virusnih infekcija po mesecima u godini i prema uzročniku koji je dokazan (od 2012. do 2016.)

MESEC	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
ROTA	22/289 (7,61%)	39/289 (13,49%)	49/289 (16,96%)	30/289 (10,38)	24/289 (8,30%)	14/289 (4,84%)	9/289 (3,11%)	11/289 (3,81)	22/289 (7,61%)	22/289 (7,61%)	19/289 (6,57%)	28/289 (9,69%)
NORO	30/231 (12,99%)	11/231 (4,76%)	23/231 (9,96%)	5/231 (2,16%)	12/231 (5,19%)	7/231 (3,03%)	16/231 (6,93%)	26/231 (11,26%)	22/231 (9,52%)	26/231 (11,26%)	33/231 (14,29%)	20/231 (8,66%)
ASTRO	3/23 (13,04)	5/23 (21,74)	3/23 (13,04)	/	/	/	/	/	1/23 (4,35)	5/23 (21,74)	5/23 (21,74)	1/23 (4,35)
ADENO	12/134 (8,96)	13/134 (9,70)	16/134 (11,94)	13/134 (9,70)	11/134 (8,21)	8/134 (5,97)	4/134 (2,99)	6/134 (4,48)	7/134 (5,22)	11/134 (8,21)	16/134 (11,94)	17/134 (12,69)
2 VIRUSA	1/32 (3,13%)	5/32 (15,63)	5/32 (15,63)	2/32 (6,25)	2/32 (6,25)	1/32 (3,13%)	1/32 (3,13%)	2/32 (6,25)	1/32 (3,13%)	5/32 (15,63)	3/32 (9,38)	4/32 (12,5)

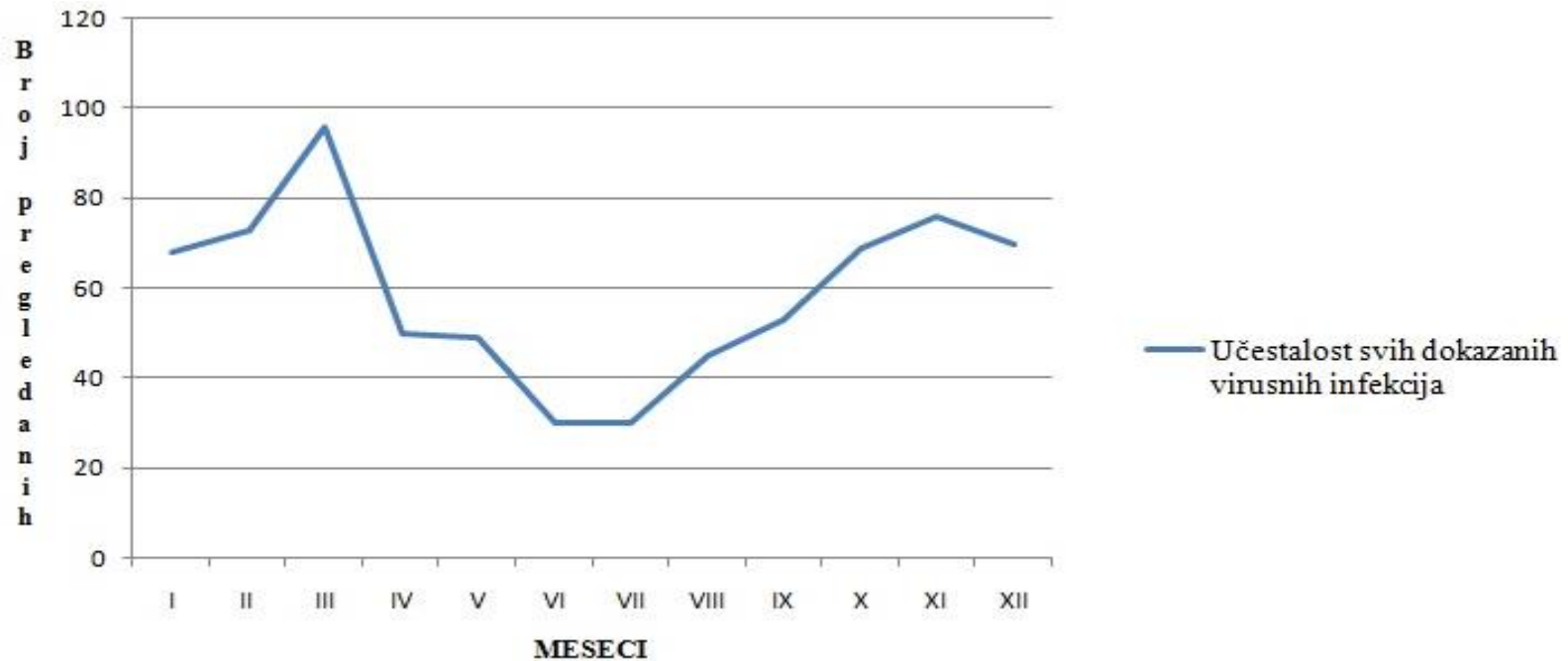


Grafikon 6. Učestalost virusnih infekcija po mesecima u godini i prema uzročniku (od 2012. do 2016.)

Tabela 22B. Učestalost svih dokazanih virusnih infekcija (rota, noro, astro i adenovirusa) po mesecima u godini (od 2012. do 2016.)

MESEC	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	68/709	73/709	96/709	50/709	49/709	30/709	30/709	45/709	53/709	69/709	76/709	70/709
	(9,59%)	(10,30%)	(13,54%)	(7,05)	(6,91%)	(4,23%)	(4,23%)	(6,35)	(7,48%)	(9,73%)	(10,72%)	(9,87%)

broj akutnih/broj ispitanih
% akutnih



Grafikon 7. Učestalost svih dokazanih virusnih infekcija po mesecima u godini na celom uzorku (od 2012. do 2016.)

6.3. Klinički pokazatelji kod obolelih

Analiziranjem kliničkih pokazatelja kod obolelih, utvrđeno je da je nagli početak bolesti postojao kod najvećeg broja ovih virusnih uzročnika (tabela 23). Nagli početak oboljenja utvrđen je kod 86,56% bolesnika (586/677) bez uključivanja obolelih kod kojih su dokazana dva virusa u uzorku stolice. Bolesnici sa dva virusa, utvrđena u uzorcima, imali su još češće nagli početak dijarealnog sindroma (u 90,63% osoba). Kod dokazanih rotavirusnih infekcija, nagli početak je utvrđen kod 88,93% obolelih (tabela 24). Kod obolelih od norovirusa, nagli početak je bio kod 83,12% (tabela 25), a kod astrovirusnih infekcija nagli početak bolesti utvrđen je kod 86,96% osoba (tabela 26). Na tabeli 27, na kojoj su prikazani klinički pokazatelji za infekcije enteričnim adenovirusom vidi se da je i kod ovih bolesnika početak bolesti nastao naglo kod većine obolelih (kod 87,31%). Jedino kod osoba starih 50 i više godina sa dokazanom adenovirusnom infekcijom, nagli početak bolesti bio je nešto ređe utvrđen – u 66,67%. Na tabeli 24 za rotaviruse, tabeli 25 za noroviruse, tabeli 26 za astroviruse, vidi se da je nagli početak bolesti bio posebno čest kod dece (uzrasta do 5 godina i 6 do 14 godina), ali i kod tinejdžera (starih 15 do 19 godina) i sasvim mladih odraslih osoba (od 20 do 29 godina). Ovo važi za sve obrađene viruse. Što su oboleli bili stariji (stariji od 30 godina, a posebno stariji od 50 godina), bolest je isto tako počinjala naglo, ali kod manjeg procenta pregledanih osoba.

Oboleli od rotavirusa bili su hospitalizovani u 86,51% slučajeva, oboleli od norovirusa u 69,70%, a oboleli od astrovirusa u 78,26% slučajeva. Kod obolelih od infekcije enteričnim adenovirusom bilo je hospitalizovano 76,12% osoba. Hospitalizovano je 26 bolesnika sa utvrđena 2 virusa (81,25%). Visok procenat hospitalizovanih bio je posebno kod dece do 5 godina (kod rotavirusne infekcije u 96,86%, kod norovirusne infekcije u 91,30%, kod astrovirusne infekcije u 83,33%, a kod adenovirusne infekcije u 85,37%). To pokazuje da je kod njih bila teža simptomatologija bolesti. U većem procentu su hospitalizovana i deca uzrasta 6 do 14 godina i tinejdžeri stari 15 do 19 godina u odnosu na starije osobe. Odrasle osobe, obolele od ovih virusnih uzročnika, bile su ređe hospitalizovane od dece (tabele 24-27).

Tabela 23. Prikaz kliničkih pokazatelja na celokupnom uzorku sa dokazanom virusnom infekcijom

VIRUSI	Početak naglo	Hospitalizacija	Epidemija (kolektiv, porodica)	Temperatura	Broj stolica (5-7)	U stolici		Muka/povraćanje	Bol u stomaku /grčevi	Glavobolja/bol u mišićima	Preznjavanje/drhtavica	Malaksalost/kolaps	Trajanje do 4 dana	Trajanje preko 4 dana
						Krv	Sluz							
ROTA	257/289 88,93%	250/289 86,51%	67/289 23,18%	282/289 97,58%	98/289 33,91%	4/289 1,38%	52/289 17,99%	169/289 58,48%	98/289 33,91%	14/289 4,84%	41/289 14,19%	45/289 15,57%	121/289 41,87%	168/289 58,13%
NORO	192/231 83,12%	161/231 69,70%	100/231 43,29%	215/231 93,07%	82/231 35,50%	5/231 2,16%	51/231 22,08%	184/231 79,65%	107/231 46,32%	24/231 10,39%	59/231 25,54%	66/231 28,57%	115/231 49,78%	116/231 50,22%
ASTRO	20/23 86,96%	18/23 78,26%	3/23 13,04%	22/23 95,65%	10/23 43,48%	1/23 4,35%	4/23 17,39%	11/23 47,83%	9/23 39,13%	2/23 8,70%	3/23 13,04%	2/23 8,70%	12/23 52,17%	11/23 47,83%
ADENO	117/134 87,31%	102/134 76,12%	22/134 16,42%	120/134 89,55%	41/134 30,60%	1/134 0,75%	9/134 6,72%	63/134 47,01%	44/134 32,84%	3/134 2,24%	18/134 13,43%	19/134 14,18%	67/134 50,0%	67/134 50,0%
DVA VIRUSA	29/32 90,63%	26/32 81,25%	14/32 43,75%	31/32 96,88%	14/32 43,75%	1/32 3,13%	4/32 12,5%	16/32 50,0%	14,32 43,75%	2/32 6,25%	5/32 15,63%	4/32 12,5%	14/32 43,75%	18/32 56,25%
Ukupno	615/709 86,74%	557/709 78,56%	206/709 29,06%	670/709 94,50%	245/709 34,56%	12/709 1,69%	120/709 16,93%	443/709 62,48%	272/709 38,36%	45/709 6,35%	126/709 17,77%	136/709 19,18%	329/709 46,40%	380/709 53,60%

broj pozitivnih na određeni klinički pokazatelj/broj pozitivnih na određeni virus
% pozitivnih na određeni klinički pokazatelj

Tabela 24. Prikaz kliničkih pokazatelja kod rotavirusnih infekcija prema starosti obolelih

Starost	Početak naglo	Hospitalizacija	Epidemija (kolektiv, porodica)	Temperatura	Broj stolica (5-7)	U stolici		Muka/povraćanje	Bol u stomaku/grčevi	Glavobolja/bol u mišićima	Preznjavanje/drhtavica	Malaksalost/kolaps	Trajanje do 4 dana	Trajanje preko 4 dana
						Krv	Sluz							
0-5 god	172/191	185/191	25/191	189/191	58/191	0/191	30/191	100/191	58/191	0/191	11/191	10/191	77/191	114/191
	90,05%	96,86%	13,09%	98,95%	30,37%	/	15,71%	52,36%	30,37%	/	5,76%	5,24%	40,31%	59,69%
6-14 god	34/36	32/36	8/36	35/36	12/36	0/36	7/36	23/36	13/36	0/36	6/36	7/36	15/36	21/36
	94,44%	88,89%	22,22%	97,22%	33,33%	/	19,44%	63,89%	36,11%	/	16,67%	19,44%	41,67%	58,33%
15-19 god	9/10	8/10	3/10	9/10	3/10	0/10	2/10	7/10	4/10	1/10	3/10	4/10	5/10	5/10
	90,0%	80,0%	30,0%	90,0%	30,0%	/	20,0%	70,0%	40,0%	10,0%	30,0%	40,0%	50,0%	50,0%
20-29 god	14/15	7/15	7/15	14/15	7/15	0/15	3/15	11/15	6/15	3/15	5/15	7/15	7/15	8/15
	93,33%	46,67%	46,67%	93,33%	46,67%	/	20,0%	73,33%	40,0%	20,0%	33,33%	46,67%	46,67%	53,33%
30-49 god	12/16	7/16	10/16	15/16	7/16	1/16	4/16	12/16	7/16	4/16	7/16	7/16	7/16	9/16
	75,0%	43,75%	62,5%	93,75%	43,75%	6,25%	25,0%	75,0%	43,75%	25,0%	43,75%	43,75%	43,75%	56,25%
≥50 god	16/21	11/21	14/21	20/21	11/21	3/21	6/21	16/21	10/21	6/21	9/21	10/21	10/21	11/21
	76,19%	52,38%	66,67%	95,24%	52,38%	14,29%	28,57%	76,19%	47,62%	28,57%	42,86%	47,62%	47,62%	52,38%
Ukupno	257/289	250/289	67/289	282/289	98/289	4/289	52/289	169/289	98/289	14/289	41/289	45/289	121/289	168/289
	88,93%	86,51%	23,18%	97,58%	33,91%	1,38%	17,99%	58,48%	33,91%	4,84%	14,19%	15,57%	41,87%	58,13%

broj pozitivnih na određeni klinički pokazatelj/broj pozitivnih na određeni virus

% pozitivnih na određeni klinički pokazatelj

Tabela 25. Prikaz kliničkih pokazatelja kod norovirusnih infekcija prema starosti obolelih

Starost	Početak naglo	Hospitalizacija	Epidemija (kolektiv, porodica)	Temperatura	Broj stolica (5-7)	U stolici		Muka/povraćanje	Bol u stomaku/grčevi	Glavobolja/bol u mišićima	Preznjavanje/drhtavica	Malaksalost/kolaps	Trajanje do 4 dana	Trajanje preko 4 dana
						Krv	Sluz							
0-5 god	60/69	63/69	10/69	65/69	26/69	0/69	11/69	50/69	24/69	0/69	4/69	3/69	36/69	33/69
	86,96%	91,30%	14,49%	94,20%	37,68%	/	15,94%	72,46%	34,78%	/	5,80%	4,35%	52,17%	47,83%
6-14 god	30/35	31/35	15/35	34/35	13/35	0/35	7/35	26/35	13/35	0/35	6/35	7/35	17/35	18/35
	85,71%	88,57%	42,86%	97,14%	37,14%	/	20,0%	74,29%	37,14%	/	17,14%	20,0%	48,57%	51,43%
15-19 god	14/16	13/16	8/16	15/16	6/16	0/16	4/16	13/16	8/16	1/16	4/16	6/16	8/16	8/16
	87,5%	81,25%	50,0%	93,75%	37,5%	/	25,0%	81,25%	50,0%	6,25%	25,0%	37,5%	50,0%	50,0%
20-29 god	33/39	19/39	20/39	36/39	12/39	0/39	10/39	32/39	20/39	6/39	12/39	17/39	19/39	20/39
	84,62%	48,72%	51,28%	92,31%	30,77%	/	25,64%	82,05%	51,28%	15,38%	30,77%	43,59%	48,72%	51,28%
30-49 god	24/31	15/31	17/31	28/31	10/31	2/31	8/31	27/31	18/31	6/31	14/31	14/31	15/31	16/31
	77,42%	48,39%	54,84%	90,32%	32,26%	6,45%	25,81%	87,10%	58,06%	19,35%	45,16%	45,16%	48,39%	51,61%
≥50 god	31/41	20/41	30/41	37/41	15/41	3/41	11/41	36/41	24/41	11/41	19/41	19/41	20/41	21/41
	75,61%	48,78%	73,17%	90,24%	36,59%	7,32%	26,83%	87,80%	58,54%	26,83%	46,34%	46,34%	48,78%	51,22%
Ukupno	192/231	161/231	100/231	215/231	82/231	5/231	51/231	184/231	107/231	24/231	59/231	66/231	115/231	116/231
	83,12%	69,70%	43,29%	93,07%	35,50%	2,16%	22,08%	79,65%	46,32%	10,39%	25,54%	28,57%	49,78%	50,22%

broj pozitivnih na određeni klinički pokazatelj/broj pozitivnih na određeni virus
% pozitivnih na određeni klinički pokazatelj

Tabela 26. Prikaz kliničkih pokazatelja kod astrovirusnih infekcija prema starosti obolelih

Starost	Početak naglo	Hospitalizacija	Epidemija (kolektiv, porodica)	Temperatura	Broj stolica (5-7)	U stolici		Muka/povraćanje	Bol u stomaku/grčevi	Glavobolja/bol u mišićima	Preznjavanje/drhtavica	Malaksalost/kolaps	Trajanje do 4 dana	Trajanje preko 4 dana
						Krv	Sluz							
0-5 god	11/12	10/12	1/12	12/12	5/12	0/12	2/12	6/12	4/12	0/12	0/12	0/12	6/12	6/12
	91,67%	83,33%	8,33%	100,0%	41,67%	/	16,67%	50,0%	33,33%	/	/	/	50,0%	50,0%
6-14 god	8/10	7/10	1/10	9/10	4/10	0/10	1/10	4/10	4/10	1/10	2/10	1/10	6/10	4/10
	80,0%	70,0%	10,0%	90,0%	40,0%	/	10,0%	40,0%	40,0%	10,0%	20,0%	10,0%	60,0%	40,0%
15-19 god	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
20-29 god	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
30-49 god	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
≥50 god	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	/	100,0%
Ukupno	20/23	18/23	3/23	22/23	10/23	1/23	4/23	11/23	9/23	2/23	3/23	2/23	12/23	11/23
	86,96%	78,26%	13,04%	95,65%	43,48%	4,35%	17,39%	47,83%	39,13%	8,70%	13,04%	8,70%	52,17%	47,83%

broj pozitivnih na određeni klinički pokazatelj/broj pozitivnih na određeni virus
% pozitivnih na određeni klinički pokazatelj

Tabela 27. Prikaz kliničkih pokazatelja kod infekcija izazvanih enteričnim adenovirusima prema starosti obolelih

Starost	Početak naglo	Hospitalizacija	Epidemija (kolektiv, porodica)	Temperatura	Broj stolica (5-7)	U stolici		Muka/povraćanje	Bol u stomaku/grčevi	Glavobolja/bol u mišićima	Preznjavanje/drhtavica	Malaksalost/kolaps	Trajanje do 4 dana	Trajanje preko 4 dana
						Krv	Sluz							
0-5 god	72/82	70/82	12/82	74/82	23/82	0/82	1/82	36/82	24/82	0/82	5/82	5/82	41/82	41/82
	87,80%	85,37%	14,63%	90,24%	28,05%	/	1,22%	43,90%	29,27%	/	6,10%	6,10%	50,0%	50,0%
6-14 god	22/25	19/25	4/25	23/25	7/25	0/25	1/25	13/25	8/25	0/25	2/25	3/25	13/25	12/25
	88,0%	76,0%	16,0%	92,0%	28,0%	/	4,0%	52,0%	32,0%	/	8,0%	12,0%	52,0%	48,0%
15-19 god	5/6	4/6	1/6	5/6	2/6	0/6	1/6	3/6	2/6	0/6	2/6	2/6	3/6	3/6
	83,33%	66,67%	16,67%	83,33%	33,33%	/	16,67%	50,0%	33,33%	/	33,33%	33,33%	50,0%	50,0%
20-29 god	8/9	5/9	2/9	8/9	4/9	0/9	2/9	4/9	4/9	1/9	4/9	4/9	5/9	4/9
	88,89%	55,56%	22,22%	88,89%	44,44%	/	22,22%	44,44%	44,44%	11,11%	44,44%	44,44%	55,56%	44,44%
30-49 god	8/9	3/9	2/9	8/9	3/9	0/9	2/9	5/9	4/9	1/9	4/9	4/9	4/9	5/9
	88,89%	33,33%	22,22%	88,89%	33,33%	/	22,22%	55,56%	44,44%	11,11%	44,44%	44,44%	44,44%	55,56%
≥50 god	2/3	1/3	1/3	2/3	2/3	1/3	2/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3
	66,67%	33,33%	33,33%	66,67%	66,67%	33,33%	66,67%	66,67%	66,67%	33,33%	33,33%	33,33%	33,33%	66,67%
Ukupno	117/134	102/134	22/134	120/134	41/134	1/134	9/134	63/134	44/134	3/134	18/134	19/134	67/134	67/134
	87,31%	76,12%	16,42%	89,55%	30,60%	0,75%	6,72%	47,01%	32,84%	2,24%	13,43%	14,18%	50,0%	50,0%

broj pozitivnih na određeni klinički pokazatelj/broj pozitivnih na određeni virus
% pozitivnih na određeni klinički pokazatelj

Epidemije su utvrđene u 29,06% osoba na celom uzorku (206/709). Kod obolelih od rotavirusa taj procenat je 23,18%, kod obolelih od norovirusa 43,29%, kod obolelih od astrovirusa 13,04% i 16,42% kod osoba sa adenovirusnom infekcijom. Udružene infekcije tokom epidemija utvrđene su kod 14 obolelih (43,75%). Epidemije i bolesti u kolektivu ili porodici bile su statistički značajno najčešće dokazane kod obolelih starijih od 50 godina ($\chi^2=12,857$; $p=0,000$). Utvrđene su često i kod mladih odraslih osoba, starih 20 do 29 godina i 30 do 49 godina. Ređe su dokazane i kod tinejdžera uzrasta 15 do 19 godina, a najređe kod dece. Dokazane bolesti u kolektivu ili porodici, odnosno, epidemije bile su konstatovane statistički značajno češće kod obolelih od norovirusa u odnosu na rota i adenovirus ($\chi^2=120,125$; $p=0,000$).

U tabeli 23, koja pokazuje kliničke pokazatelje na ukupnom uzorku obolelih osoba sa dokazanom infekcijom rota, noro, astro i adenovirusima, povišenu temperaturu je imalo 94,50% obolelih (97,58% sa rotavirusnom infekcijom, 93,07% sa norovirusnom infekcijom, 95,65% sa astrovirusnom infekcijom i 89,55% sa adenovirusnom infekcijom). Bolesnici sa dokazana 2 virusa imali su temperaturu u 96,88% (tabela 23). Kod obolelih sa udruženom infekcijom temperaturu 38-39°C imalo je 20 osoba (64,52%), a temperaturu veću od 39°C imale su 4 osobe (12,90%). Na tabeli 24 vidi se da su skoro sva deca stara do 5 godina i 6 do 14 godina, kod koje je utvrđen rotavirus, imala temperaturu (deca do 5 godina u 98,95%, a deca stara 6 do 14 godina u 97,22%). Od 289 rota pozitivnih osoba, temperaturu je imalo 282 bolesnika (97,58%), a od 282 obolele osobe koje su imale temperaturu, njih 210 (74,47%) imali su temperaturu 38-39°C, a 8 osoba (2,84%) imali su temperaturu veću od 39°C.

Od 231 bolesnika sa norovirusnom infekcijom, njih 215 (93,07%) imalo je temperaturu (tabela 25). Temperaturu 38-39°C utvrđena je kod 161 osoba (74,88%), a 4 osobe su imale temperaturu veću od 39°C (1,86%).

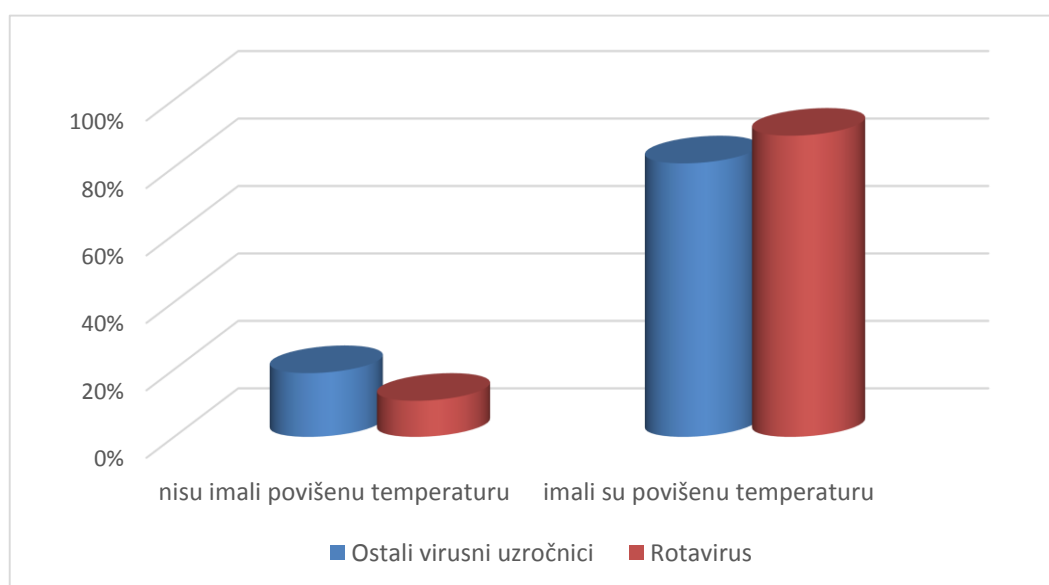
Od 23 bolesnika sa dijagnostikovanom astrovirusnom infekcijom, njih 22 (95,65%) je imalo temperaturu (tabela 26). Temperaturu 38-39°C imalo je 14 osoba (63,64%), a preko 39°C samo jedna osoba (4,55%).

Kod 134 osobe sa dokazanom infekcijom enteričnim adenovirusom, njih 120 (89,55%) imali su povišenu temperaturu (tabela 27). Temperaturu 38-39°C imale su 82 osobe (68,33%), a temperaturu preko 39°C imale su dve osobe (1,67%).

Na osnovu navedenih podataka, može se utvrditi da je statistički značajno više pacijenata sa rotavirusnom infekcijom imalo povišenu temperaturu u odnosu na one kod kojih su utvrđeni drugi virusni uzročnici ($\chi^2=9,208$; $p=0,002$, tabela 28 i grafikon 8).

Tabela 28. Učestalost febrilnosti kao simptoma kod rotavirusnih infekcija u odnosu na druge virusne uzročnike

		Rotavirus					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Povišena temperatura	ne	74	18,9%	34	10,7%	108	15,2%
	da	317	81,1%	284	89,3%	601	84,8%
	Ukupno	391	100,0%	318	100,0%	709	100,0%



Grafikon 8. Procenat febrilnosti kao simptoma kod rotavirusnih infekcija u odnosu na druge virusne uzročnike

U tabeli 24 vidi se da je kod obolelih od rotavirusa najčešće bilo 5 do 7 stolica dnevno (kod 98 bolesnika – u 33,91%). Više od 7 stolica utvrđeno je kod 94 bolesnika – 32,53%.

Bolesnici sa norovirusnom infekcijom imali su najčešće 5 do 7 stolica dnevno (kod 82 bolesnika - 35,50%, tabela 25). Više od 7 stolica dnevno utvrđeno je kod 71 bolesnika (30,74%).

Bolesnici sa astrovirusnom infekcijom imali su najčešće 5 do 7 stolica dnevno i to 10 osoba (43,48%, tabela 26). Više od 7 stolica imala su 4 bolesnika (17,39%).

Na uzorku 134 bolesnika, koji su bili pozitivni na enterični adenovirus, 5 do 7 stolica imala je 41 osoba (30,60%, tabela 27). Više od 7 stolica bilo je kod 40 bolesnika (29,85%).

Većina pregledanih sa dokazana dva virusa u stolici imala je 5 do 7 stolica (14 bolesnika – 43,75%). Više od 7 stolica utvrđeno je kod 8 osoba (25,0%).

Nisu postojale statistički značajne razlike u broju dijarealnih stolica, ako se posmatraju oboleli svih starosnih grupa, koji su bili pozitivni na neki od ispitivanih virusa. Ovo važi i za bolesnike kod kojih su dokazana dva virusa u uzorku stolice. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u broju dijarealnih stolica analizom broja stolica kod obolelih od rotavirusa (najčešćeg uzročnika dijareje) u odnosu na ostale virusne uzročnike studentovim T testom na ukupnom uzorku (T test, $t=1,089$; $p=0,277$). Studentovim T testom nije utvrđena statistički značajna razlika u broju dijarealnih stolica ni kod dece do 14 godina sa rotavirusnom infekcijom u odnosu na druge virusne uzročnike (T test, $t=1,185$; $p=0,237$, tabela 29).

Tabela 29. Broj dijarealnih stolica kod dece do 14 godina obolele od rotavirusa u odnosu na druge virusne uzročnike

	N	Prosek	SD	Minimum	Maximum
Drugi uzročnik	233	5,54	3,154	3	20
Rota virus	227	5,90	3,477	3	20
ukupno	460	5,72	3,319	3	20

Krv je bila utvrđena u stolici vrlo retko (kod 1,38% osobe sa rotavirusnom infekcijom, kod 2,16% bolesnika sa norovirusnom infekcijom, kod 0,75% obolelih sa adenovirusnom infekcijom i kod po jedne osobe sa astrovirusnom infekcijom i uruženom infekcijom).

Sluzi je bilo u dijarealnoj stolici kod 17,99% obolelih od rotavirusa, u 22,08% osoba sa dokazanom norovirusnom infekcijom, kod 17,39% bolesnika sa dokazanim astrovirusom, kod 6,72% obolelih od enteričnih adenovirusa i kod 12,5% osoba sa utvrđena 2 virusa u stolici.

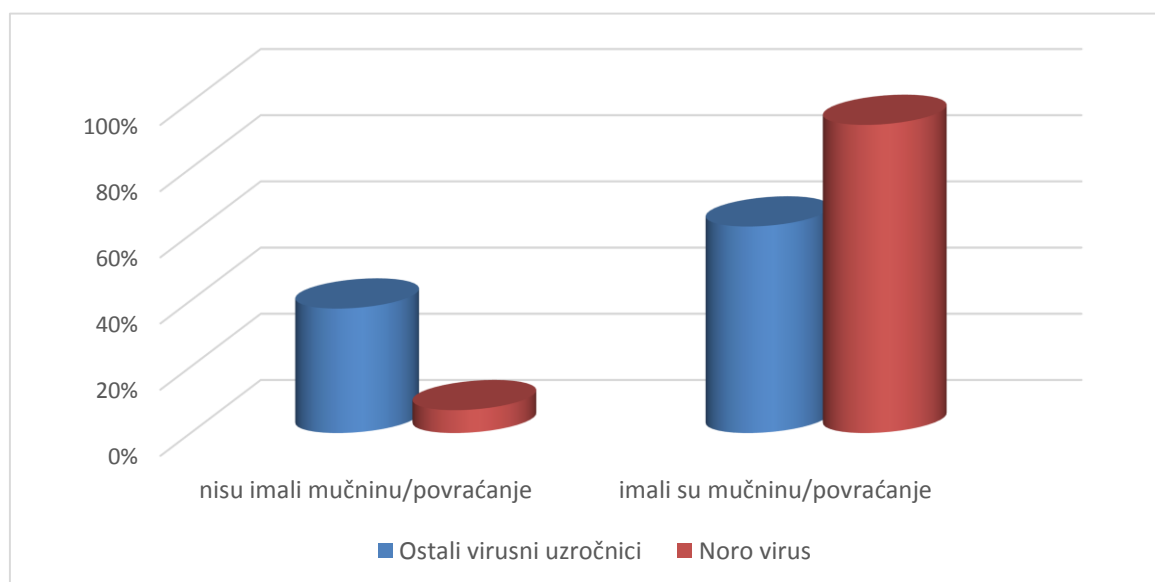
Broj stolica i opšte karakteristike dijarealnih uzoraka stolice nisu pokazivale bitne razlike u odnosu na vrstu virusnog uzročnika. Jedino je krvi u stolici bilo kod starijih osoba. Sluzi u stolici je bilo najređe kod obolelih od enteričnih adenovirusa, a najviše kod obolelih od norovirusa, iako to nema većeg dijagnostičkog značaja (tabela 23).

Muka i povraćanje bili su prateći simptomi kod 58,48 obolelih od rotavirusa, kod 79,65% bolesnika sa norovirusnom infekcijom, kod 47,83% osoba sa utvrđenom astrovirusnom infekcijom, kod 47,01% obolelih od adenovirusa i kod 50,0% osoba sa udruženim infekcijama (tabela 23). Najčešće su muka i povraćanje bili prateći simptomi kod infekcije norovirusom i češći su se javljali

kod tinejdžera i odraslih osoba, nego kod dece (tabela 25). Kod bolesnika sa norovirusnom infekcijom najčešće su se muka i povraćanje javljali kod osoba starih 30 do 49 godina (kod 87,10% ispitanika) i kod obolelih starih 50 i više godina (kod 87,80%). Muka i povraćanje su kod rotavirusnih infekcija bili češći kod tinejdžera i odraslih osoba, nego kod dece, isto kao kod norovirusne infekcije (tabela 24). Statistički značajno češće su muka i povraćanje bili prisutni kao prateći simptomi kod infekcije norovirusom u odnosu na ostale uzročnike ($\chi^2=71,340$; $p=0,000$; tabela 30 i grafikon 9).

Tabela 30. Učestalost muke i povraćanja kao simptoma kod norovirusnih infekcija u odnosu na druge virusne uzročnike

		Norovirus					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Mučnina/povraćanje	ne	159	35,4%	18	6,9%	177	25,0%
	da	290	64,6%	242	93,1%	532	75,0%
	Ukupno	449	100,0%	260	100,0%	709	100,0%



Grafikon 9. Procenat muke i povraćanja kao simptoma kod norovirusnih infekcija u odnosu na druge virusne uzročnike

Bolove u stomaku – grčeve najčešće su imali oboleli od norovirusne infekcije (46,32%). Ovi simptomi bili su češći kod starijih osoba, posebno kod starih 30 do 49 godina (u 58,06%) i starih 50 i više godina (u 58,54%, tabela 25). Kod obolelih od rotavirusa, grčeve je imalo 33,91% obolelih, nešto češće starije osobe (tabela 24). Kod infekcija astrovirusom bolovi u stomaku postojali su kod 39,13% obolelih (tabela 26). Na tabeli 27 vidi se da su osobe sa adenovirusnom infekcijom imale grčeve u stomaku u 32,84%, a bolesnici kod kojih su dokazana 2 virusa u uzorcima stolice imali su bolove u stomaku u 43,75% (tabela 23).

Glavobolju i bolove u mišićima imao je znatno manji broj obolelih. Kod norovirusne infekcije 10,39% bolesnika imalo je ove tegobe i to uglavnom osobe starije od 20 godina (tabela 25). Kod rotavirusne infekcije glavobolja i bolovi u mišićima utvrđeni su kod 4,84% obolelih, uglavnom kod osoba starijih od 20 godina (tabela 24). Bolesnici sa astrovirusnom infekcijom nisu imali glavobolju i bol u mišićima kao prateći simptom bolesti (tabela 26). Kod bolesnika sa dokazana 2 virusa, glavobolja i bolovi u mišićima postojali su kod 6,25%, a kod obolelih od enteričnih adenovirusa ovi simptomi postojali su kod 2,24% obolelih (tabela 27).

Preznojavanje i drhtavicu najčešće su imali oboleli od norovirusa (u 25,54% bolesnika, tabela 25). Kod obolelih od rotavirusnog gastroenterokolitisa preznojavanje i drhtavicu imalo 14,19% pregledanih osoba (tabela 24), kod astrovirusne infekcije ove simptome imalo je 13,04% obolelih (tabela 26), a kod obolelih od enteričnih adenovirusa, preznojavanje i drhtavica postojali su kod 13,43% (tabela 27). Bolesnici sa dokazana dva virusa imali su preznojavanje i drhtavicu u 15,63% slučajeva.

Malaksalost i kolaps su najčešće bili utvrđeni kod obolelih od norovirusa u 28,57% osoba, dok je taj procenat kod rota pozitivnih bolesnika bio 15,57%, kod astrovirusne infekcije 8,70%, a kod infekcije adenovirusima 14,18%. Kod osoba sa dokazana dva virusa malaksalost i kolaps su utvrđeni u 12,5% bolesnika (tabela 23).

Kod infekcije rotavirusom bolest je trajala do četiri dana kod 41,87% obolelih, a više od četiri dana kod 58,13% osoba sa dijarealnim sindromom. Kod norovirusne infekcije bolest je trajala do četiri dana kod 49,78%, a više od četiri dana kod 50,22% bolesnika. Kod obolelih od astrovirusne infekcije bolest je trajala do četiri dana kod 52,17% inficiranih osoba, a više od četiri dana kod 47,83% bolesnika, a kod obolelih sa dokazanom adenovirusnom infekcijom, bolest je trajala do četiri dana kod 50,0% bolesnika, a trajanje duže od četiri dana utvrđeno je isto tako kod 50,0% obolelih osoba (tabela 23).

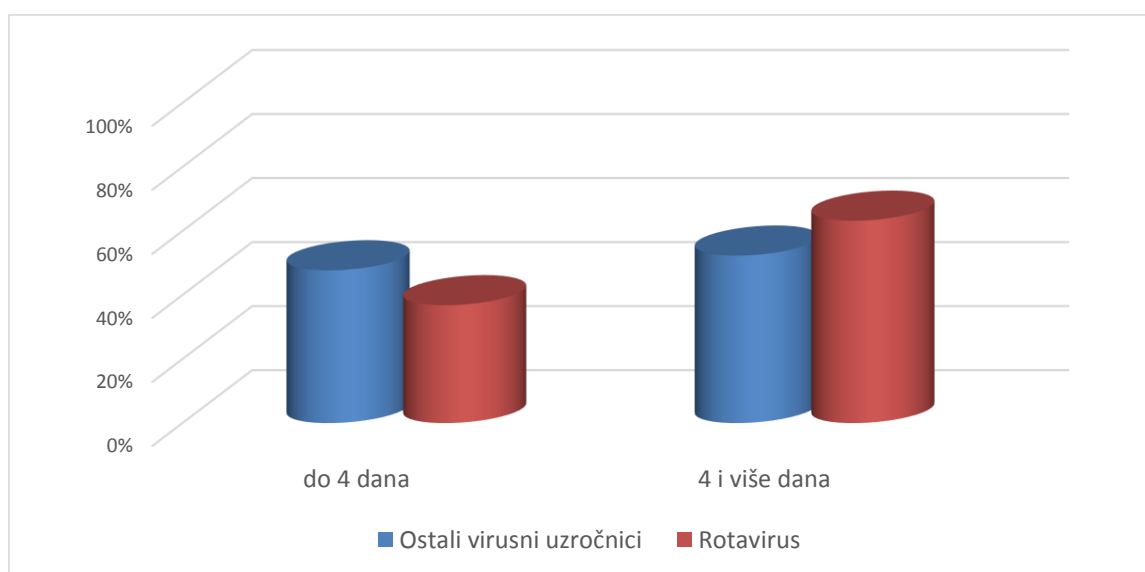
Kod bolesnika kod kojih su dokazana dva virusa u uzorku stolice bolest je trajala do 4 dana kod 43,75% slučajeva, a više od 4 dana kod 56,25% obolelih. Osim nešto dužeg trajanja bolesti kod

ovih obolelih osoba, kod njih je bila nešto češća i hospitalizacija (u 81,25%), a teža je bila i klinička slika, nego kod osoba kod kojih je dokazan jedan virus u stolici (tabela 23).

Kod ukupnog broja obolelih od rotavirusa, bolest je trajala statistički značajno duže (više od četiri dana) u odnosu na obolele od drugih pregledanih virusa ($\chi^2=8,501$; $p=0,004$, tabela 31 i grafikon 10).

Tabela 31. Trajanje bolesti kod rotavirusnih infekcija u odnosu na druge virusne uzročnike

		Rotavirus					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Trajanje bolesti	do 4 dana	186	47,7%	117	36,8%	303	42,8%
	4 i više dana	204	52,3%	201	63,2%	406	57,2%
	Ukupno	390	100,0%	318	100,0%	709	100,0%



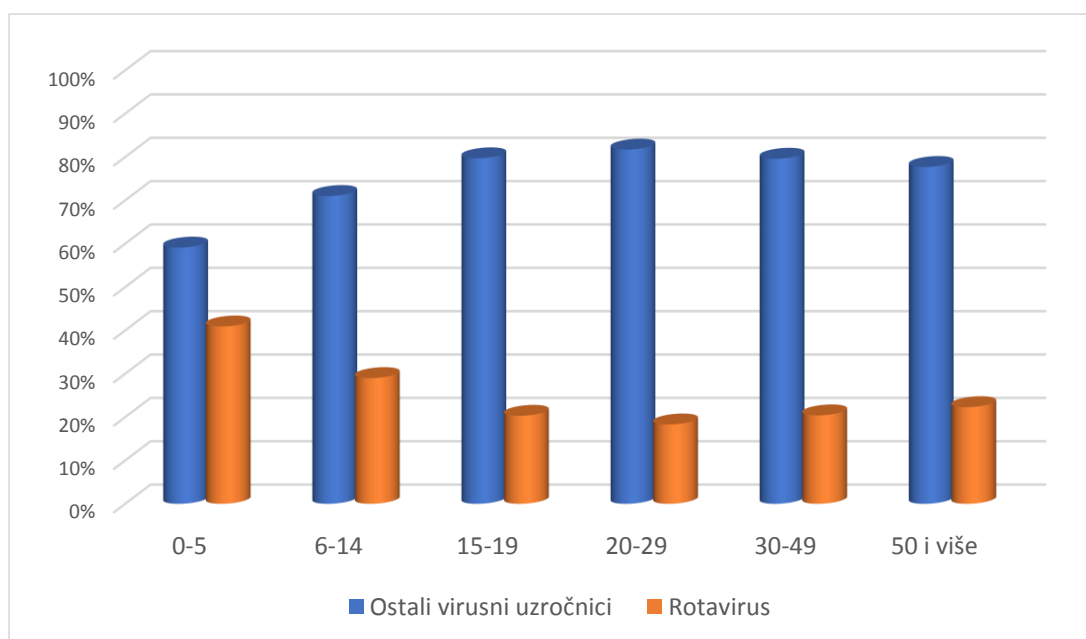
Grafikon 10. Trajanje bolesti kod rotavirusnih infekcija u odnosu na druge virusne uzročnike

U tabeli 32 analizirana je učestalost rotavirusnih infekcija prema starosnim grupama obolelih u odnosu na ostale virusne uzročnike, pri čemu je analiziran celokupni uzorak (1003 pregledane osobe). Pored 289 rota pozitivnih koji su imali samo rotavirus u uzorku, dodato je i 29 obolelih osoba, koje su imale udružene infekcije, od kojih je jedan bio rotavirus. Tako je rota pozitivnih bilo 318. Ovi podaci pokazuju da je statistički veoma značajno više pacijenata zaraženih

rotavirusom bilo kod dece uzrasta do 5 godina u odnosu na ostale starosne grupe obolelih ($\chi^2=41,737$; $p=0,000$, tabela 32 i grafikon 11).

Tabela 32. Učestalost rotavirusnih infekcija prema starosnim grupama u odnosu na ostale ispitivane viruse

		STAROSNE GRUPE													
		0-5		6-14		15-19		20-29		30-49		≥50		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ROTA	ne	290	59,1%	103	71,0%	51	79,7%	76	81,7%	78	79,6%	87	77,7%	685	68,3%
	da	201	40,9%	42	29,0%	13	20,3%	17	18,3%	20	20,4%	25	22,3%	318	31,7%
	Ukupno	491	100,0%	145	100,0%	64	100,0%	93	100,0%	98	100,0%	112	100,0%	1003	100,0%



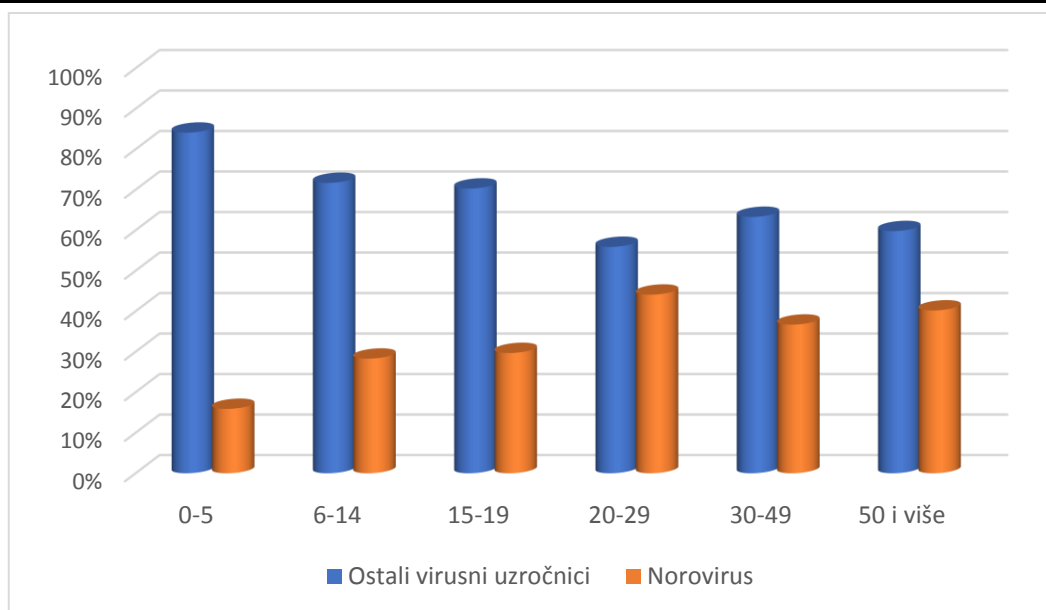
Grafikon 11. Procenat rotavirusnih infekcija prema starosnim grupama u odnosu na ostale ispitivane viruse

U tabeli 33, na celokupnom uzorku od 1003 pregledane osobe, analizirana je učestalost norovirusnih infekcija prema starosnim grupama obolelih u odnosu na ostale virusne uzročnike. Pored 231 noro pozitivne osobe, koje su imale samo norovirus u uzorku, dodato je i 29 obolelih osoba koje su imale udružene infekcije, od kojih je jedan bio norovirus. Tako je noro pozitivnih bilo

260. Dobijeni podaci pokazuju da je statistički veoma značajno više pacijenata zaraženih norovirusom bilo u dobnim grupama preko 20 godina ($\chi^2=60,445$; $p=0,000$, tabela 33 i grafikon 12).

Tabela 33. Učestalost norovirusnih infekcija prema starosnim grupama u odnosu na ostale ispitivane viruse

		UZRAST													
		0-5		6-14		15-19		20-29		30-49		≥50		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
NORO	ne	413	84,1%	104	71,7%	45	70,3%	52	55,9%	62	63,3%	67	59,8%	743	74,1%
	da	78	15,9%	41	28,3%	19	29,7%	41	44,1%	36	36,7%	45	40,2%	260	25,9%
	Ukupno	491	100,0%	145	100,0%	64	100,0%	93	100,0%	98	100,0%	112	100,0%	1003	100,0%



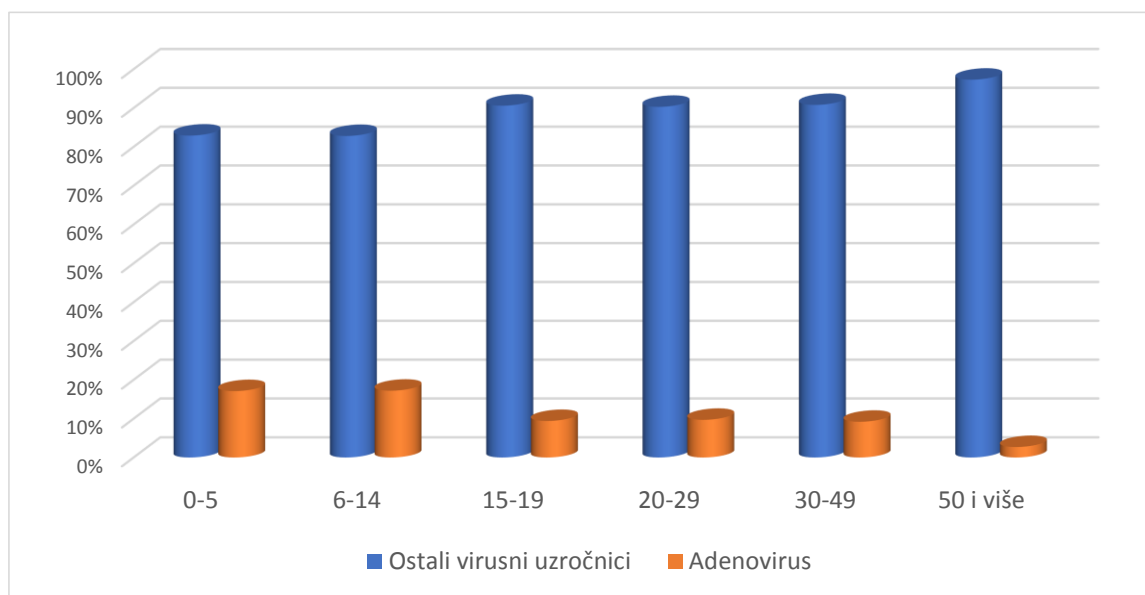
Grafikon 12. Procenat norovirusnih infekcija prema starosnim grupama u odnosu na ostale ispitivane viruse

U tabeli 34, na celokupnom uzorku od 1003 pregledane osobe, analizirana je učestalost infekcija izazvanih enteričnim adenovirusima prema starosnim grupama obolelih u odnosu na ostale virusne uzročnike. Pored 134 adeno pozitivnih osoba, koje su imale samo adenovirus u uzorku, dodata su i 2 bolesnika, koja su imala udružene infekcije, od kojih je jedan bio adenovirus. Tako je adeno pozitivnih bilo 136. Dobijeni podaci pokazuju da je statistički veoma značajno više

pacijenata zaraženih adenovirusom bilo u uzrastu mlađem od 14 godina (deca mlađa od 5 godina i stara 6 do 14 godina zajedno) u odnosu na ostale starosne grupe ($\chi^2=22,018$; $p=0,001$, tabela 34 i grafikon 13).

Tabela 34. Učestalost adenovirusnih infekcija prema starosnim grupama u odnosu na ostale ispitivane viruse

		UZRAST													
		0-5		6-14		15-19		20-29		30-49		≥50		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ADENO	ne	407	82,9%	120	82,8%	58	90,6%	84	90,3%	89	90,8%	109	97,3%	867	86,4%
	da	84	17,1%	25	17,2%	6	9,4%	9	9,7%	9	9,2%	3	2,7%	136	13,6%
	Ukupno	491	100,0%	145	100,0%	64	100,0%	93	100,0%	98	100,0%	112	100,0%	1003	100,0%



Grafikon 13. Procenat adenovirusnih infekcija prema starosnim grupama u odnosu na ostale ispitivane viruse

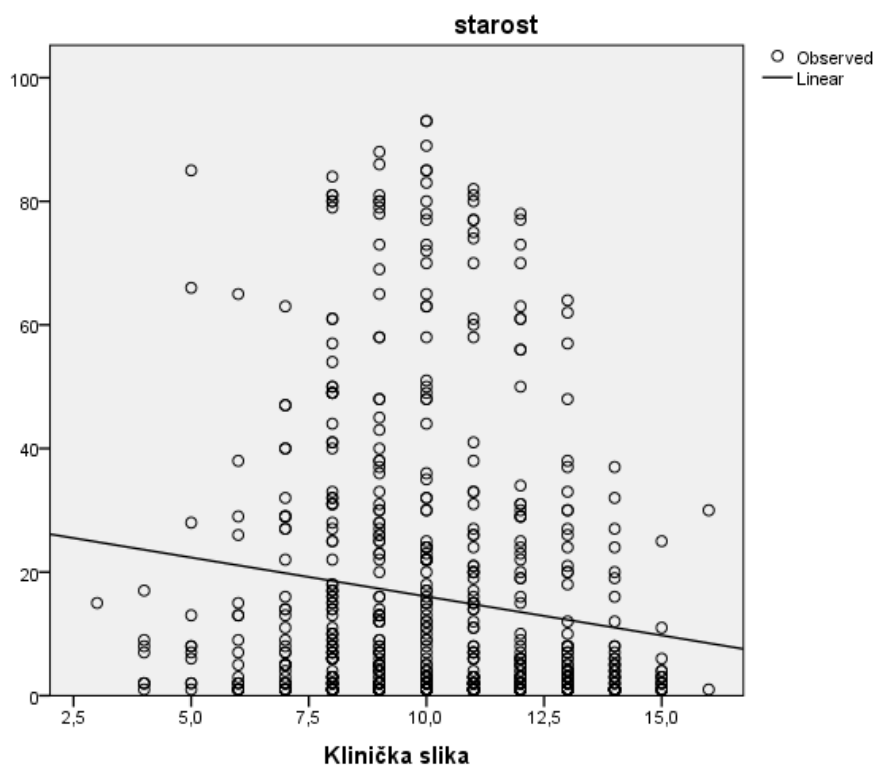
6.4. Procena težine kliničke slike prema Vesikari skali

Na osnovu Vesikari skale, koja služi za utvrđivanje težine kliničke slike obolelih od virusnog gastroenterokolitisa, svi pregledani pacijenti su grupisani u tri kategorije: blagu, srednje tešku i tešku kliničku sliku. Pošto je u nekim starosnim grupama bolesnika sa blagom kliničkom slikom bilo u vrlo malom broju (čak pojedinačno), da bi se mogla izvršiti validna statistička analiza, bolesnici sa blagom i srednje teškom kliničkom slikom grupisani su zajedno i upoređeni su sa obolelima koji su imali tešku kliničku sliku. Tako je utvrđeno da je statistički značajno više pacijenata sa teškom kliničkom slikom bilo u starosnoj grupi mlađih od 5 godina u odnosu na ostale starosne grupe ($\chi^2=28,611$; $p=0,000$, tabela 35).

Tabela 35. Prikaz težine kliničke slike pacijenata sa dokazanim akutnim virusnim gastroenterokolitisom prema starosnim grupama

		STAROSNE GRUPE													
		0-5		6-14		15-19		20-29		30-49		50 i više		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Klinička slika	Blaga i srednje teška	165	45,2%	73	64,6%	22	62,9%	38	58,5%	43	70,5%	46	65,7%	387	54,6%
	Teška	200	54,8%	40	35,4%	13	37,1%	27	41,5%	18	29,5%	24	34,3%	322	45,4%
	Ukupno	365	100,0%	113	100,0%	35	100,0%	65	100,0%	61	100,0%	70	100,0%	709	100,0%

Posmatrajući težinu kliničke slike kod svih obolelih, dobijamo da postoji statistički značajna korelacija starosti i težine kliničke slike ($r=-0,141$; $p=0,000$). Korelacija je neznačajna, što znači da sa povećanjem godina, bila je blaža klinička slika (grafikon 14).

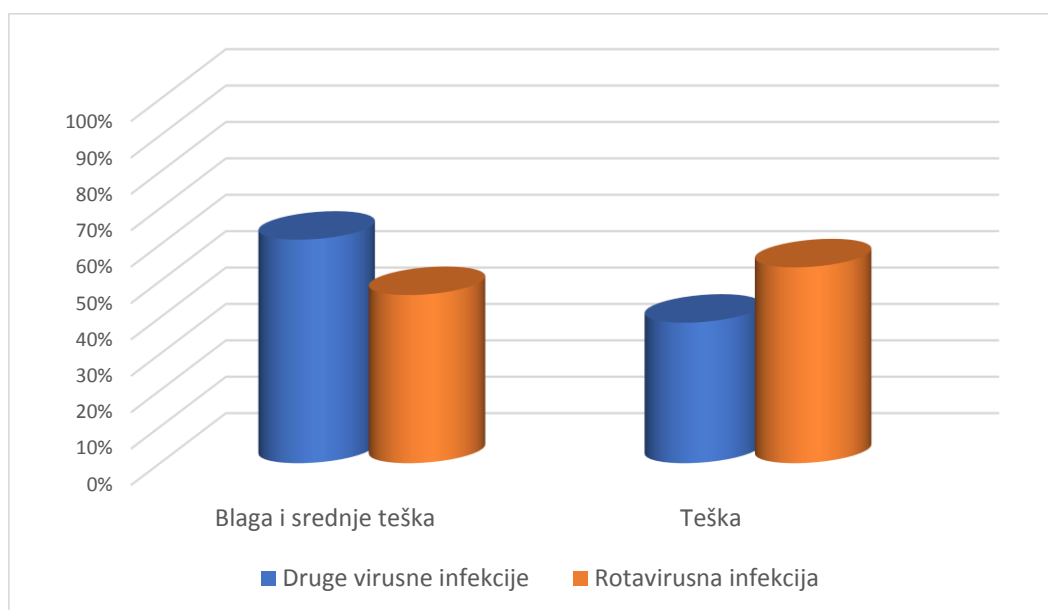


Grafikon 14. Korelacija između starosti obolelih sa dokazanim virusnim gastroenterokolitismom i težine kliničke slike

Statistički značajno više pacijenata sa rotavirusnom infekcijom imalo je težu kliničku sliku u odnosu na one obolele od drugih ispitivanih virusa ($\chi^2=16,247$; $p=0,000$, tabela 36 i grafikon 15).

Tabela 36. Težina kliničke slike kod obolelih od rotavirusa u odnosu na obolele od drugih ispitivanih virusa

		Rotavirus					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Klinička slika	Blaga i srednje teška	240	61,4%	147	46,2%	387	54,6%
	Teška	151	38,6%	171	53,8%	322	45,4%
	Ukupno	391	100,0%	318	100,0%	709	100,0%



Grafikon 15. Težina kliničke slike kod obolelih od rotavirusne infekcije u odnosu na obolele od drugih virusnih infekcija

Kod obolelih od norovirusne infekcije nema statistički značajne razlike u težini kliničke slike u odnosu na obolele od drugih ispitivanih virusnih uzročnika ($\chi^2=1,229$; $p=0,268$, tabela 37).

Tabela 37. Težina kliničke slike kod obolelih od norovirusa u odnosu na obolele od drugih ispitivanih virusa

		Norovirus					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Klinička slika	Blaga i srednje teška	238	53,0%	149	57,3%	387	54,6%
	Teška	211	47,0%	111	42,7%	322	45,4%
	Ukupno	449	100,0%	260	100,0%	709	100,0%

Kod obolelih od astrovirusne infekcije, isto tako, nema statistički značajne razlike u težini kliničke slike u odnosu na obolele od drugih ispitivanih virusnih uzročnika ($\chi^2=0,085$; $p=0,771$, tabela 38).

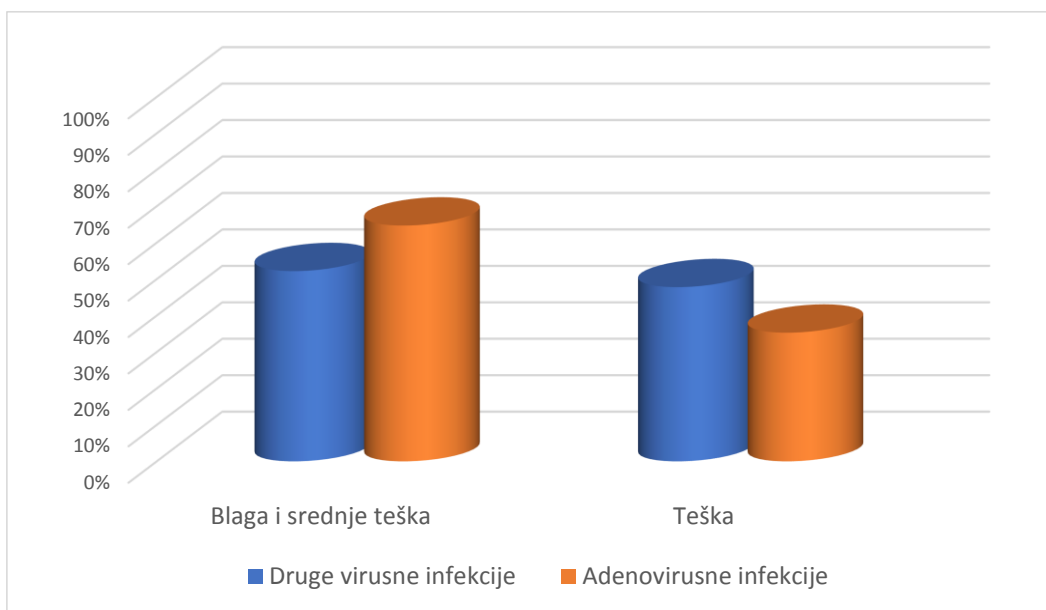
Tabela 38. Težina kliničke slike kod obolelih od astrovirusa u odnosu na obolele od drugih ispitivanih virusa

		Astrovirus					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Klinička slika	Blaga i srednje teška	373	54,7%	14	51,9%	387	54,6%
	Teška	309	45,3%	13	48,1%	322	45,4%
	Ukupno	682	100,0%	27	100,0%	709	100,0%

Statistički značajno više pacijenata sa adenovirusnom infekcijom imali su blagu i srednje tešku kliničku sliku u odnosu na obolele od drugih ispitivanih virusnih uzročnika ($\chi^2=6,955$; $p=0,008$, tabela 39 i grafikon 16).

Tabela 39. Težina kliničke slike kod obolelih od adenovirusa u odnosu na obolele od drugih ispitivanih virusa

		Adenovirus					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Klinička slika	Blaga i srednje teška	299	52,2%	88	64,7%	387	54,6%
	Teška	274	47,8%	48	35,3%	322	45,4%
	Ukupno	573	100,0%	136	100,0%	709	100,0%

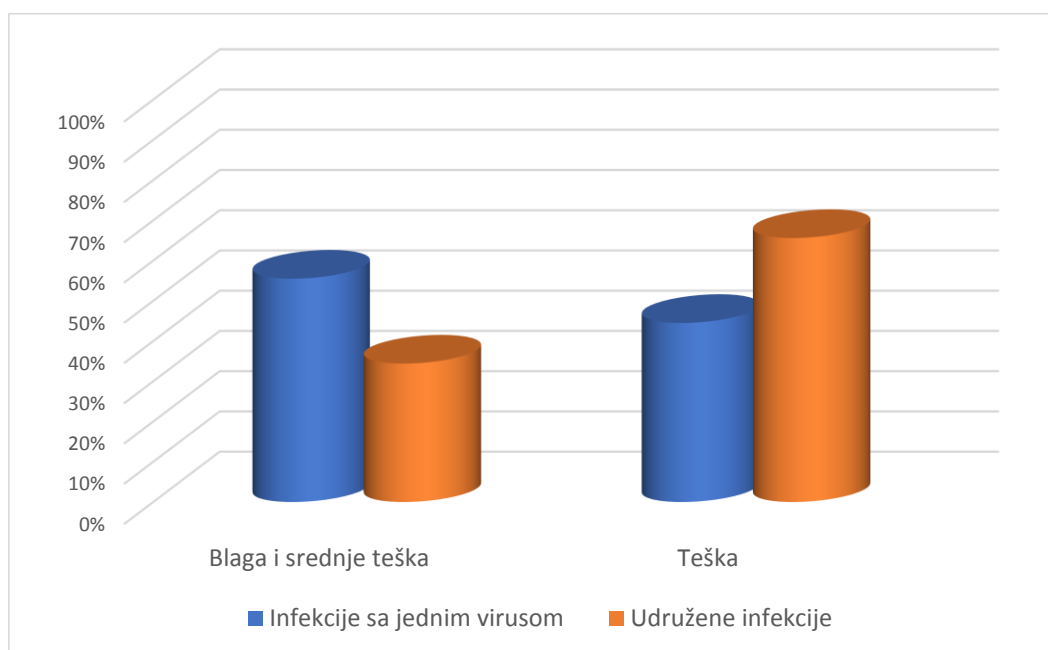


Grafikon 16. Težina kliničke slike kod obolelih od adenovirusne infekcije u odnosu na obolele od drugih virusnih infekcija

Statistički značajno više pacijenata sa udruženim infekcijama imali su težu kliničku sliku u odnosu na obolele sa dokazanim jednim virusnim uzročnikom ($\chi^2=5,521$; $p=0,019$, tabela 40 i grafikon 17).

Tabela 40. Težina kliničke slike kod obolelih sa udruženim infekcijama u odnosu na obolele sa jednim dokazanim virusom

		Udružene infekcije					
		ne		da		Ukupno	
		N	%	N	%	N	%
Klinička slika	Blaga i srednje teška	376	55,5%	11	34,4%	387	54,6%
	Teška	301	44,5%	21	65,6%	322	45,4%
	Ukupno	677	100,0%	32	100,0%	709	100,0%



Grafikon 17. Težina kliničke slike kod obolelih sa udruženom infekcijom u odnosu na obolele sa jednim dokazanim virusom

6.5. Podaci o potvrđenim epidemijama virusnih gastroenterokolitisa i sporadičnom javljanju bolesti u petogodišnjem periodu u Vojvodini

Pregledani uzorci 1003 obolele osobe u petogodišnjem periodu sadržali su i uzorke stolica bolesnika, koji su bili upućeni na pregled tokom pojave epidemija u kolektivima ili u porodicama, kao i uzorke stolice kod sporadičnih slučajeva bolesti.

U petogodišnjem periodu na teritoriji Vojvodine kod 22 epidemije u kolektivima i kod 9 porodičnih epidemija real-time PCR metodom dokazani su virusi kao uzročnici. Epidemije su bile utvrđene u Gerontološkim centrima, predškolskim i školskim ustanovama, internatima, bolnicama, domu za lica sa oštećenim vidom, zatim kod radnika na gradilištima, među članovima filmske ekipe i u preduzećima.

U tabeli 41 prikazani su podaci o potvrđenim epidemijama virusnih gastroenteritisa tokom ovog istraživanja.

Tabela 41. Epidemije izazvane virusima u petogodišnjem periodu na teritoriji Vojvodine

Godina epidemije	Mesto epidemije	Broj obolelih	Dokazan virus	Način širenja
2012.	Gerontološki centar u Novom Sadu	26	Norovirus	kontaktom
2012.	Teritorija Bača	17	Rotavirus, norovirus	kontaktom
2012.	Porodična epidemija u Zrenjaninu	5	Norovirus	kontaktom
2013.	Škola u Beočinu i Suseku	10	Rotavirus	kontaktom
2013.	Internat u Totovom selu	24	Norovirus	kontaktom
2013.	Opšta bolnica u Kikindi	16	Norovirus	kontaktom
2013.	Porodična epidemija u Novom Sadu	3	Norovirus	kontaktom
2013.	Gerontološki centar u Futogu	17	Norovirus	kontaktom
2014.	GAK u Novom Sadu	5	Adenovirus	kontaktom
2014.	Dom Brankovo kolo u Novom Sadu	42	Rotavirus, norovirus	hranom
2014.	Teritorija Beočina	71	Rotavirus, norovirus	kontaktom
2014.	Porodična epidemija u Novom Sadu	10	Norovirus	kontaktom
2014.	Gerontološki centar u Novom Sadu	43	Norovirus	kontaktom
2015.	Gerontološki centar u Rumi	53	Rotavirus, norovirus	kontaktom
2015.	Porodična epidemija u Mačvanskoj Mitrovici	21	Rotavirus	hranom
2015.	Porodična epidemija u Sremskoj Mitrovici	5	Norovirus	hranom i kontaktom
2015.	Porodična epidemija u Novom Sadu	5	Norovirus	hranom
2015.	Predškolska ustanova u Novom Sadu	15	Norovirus	kontaktom
2015.	Filmska ekipa u Bečeju	14	Norovirus	hranom
2015.	Porodična epidemija u Kisaču	6	Norovirus	kontaktom
2015.	Porodična epidemija u Kisaču	3	Norovirus	kontaktom
2016.	Dom za lica sa oštećenim vidom u Pančevu	23	Norovirus	kontaktom
2016.	Bolnica za rehabilitaciju u Melencima	24	Norovirus	kontaktom
2016.	Gerontološki centar u Futogu	75	Norovirus	kontaktom
2016.	Epidemija u preduzeću u Sremskoj Mitrovici	19	Norovirus	hranom
2016.	Porodična epidemija u Novom Sadu	3	Norovirus	kontaktom
2016.	Epidemija na gradilištu u Novom Sadu	10	Norovirus	hranom
2016.	Produženi boravak za decu u Sremskoj Kamenici	11	Norovirus, adenovirus	kontaktom
2016.	Centar za policijsku obuku u Sremskoj Kamenici	120	Norovirus, adenovirus	hranom i kontaktom
2016.	Osnovna škola u Baču	45	Rotavirus, norovirus	kontaktom
2016.	Dom za stare osobe u Molu	67	Adenovirus	kontaktom

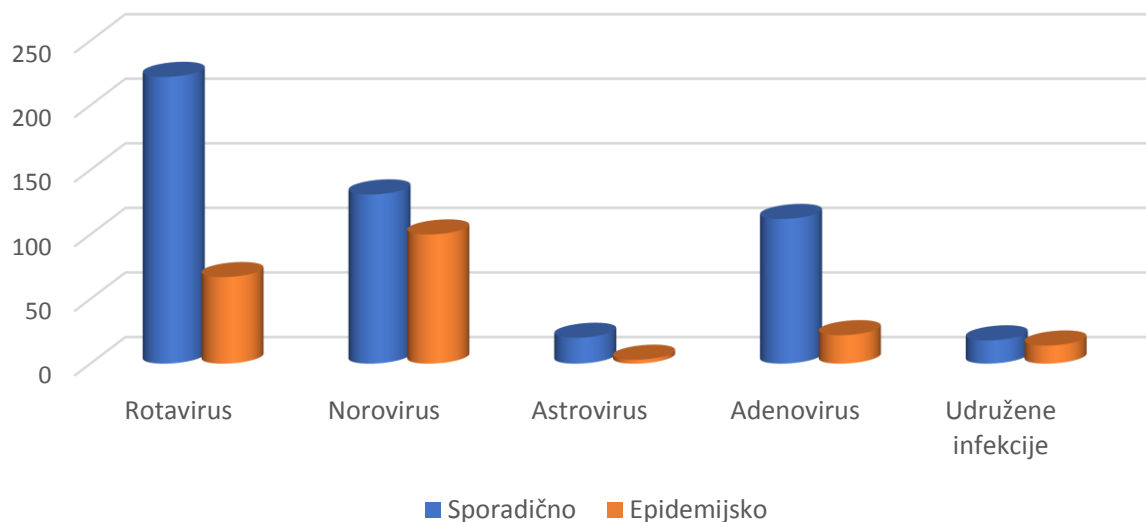
Tabela 42. Epidemijsko i sporadično javljanje virusnih gastroenterokolitisa prema uzročniku i starosnim grupama

Starost	ROTAVIRUS		NOROVIRUS		ASTROVIRUS		ADENOVIRUS		2 VIRUSA		UKUPNO	
	Epidemij-ski	Sporadi-čno	Epidemij-ski	Sporadi-čno	Epidemij-ski	Sporadi-čno	Epidemij-ski	Sporadi-čno	Epidemij-ski	Sporadi-čno	Epidemij-ski	Sporadi-čno
0-5 god	25/191	166/191	10/69	59/69	1/12	11/12	12/82	70/82	2/11	9/11	50/365	315/365
	13,09%	86,91%	14,49%	85,51%	8,33%	91,67%	14,63%	85,37%	18,18%	81,82%	13,70%	86,30%
6-14 god	8/36	28/36	15/35	20/35	1/10	9/10	4/25	21/25	2/7	5/7	30/113	83/113
	22,22%	77,78%	42,86%	57,14%	10,0%	90,0%	16,0%	84,0%	28,57%	71,43%	26,55%	73,45%
15-19 god	3/10	7/10	8/16	8/16	/	/	1/6	5/6	1/3	2/3	13/35	22/35
	30,0%	70,0%	50,0%	50,0%			16,67%	83,33%	33,33%	66,67%	37,14%	62,86%
20-29 god	7/15	8/15	20/39	19/39	/	/	2/9	7/9	1/2	1/2	30/65	35/65
	46,67%	53,33%	51,28%	48,72%			22,22%	77,78%	50,0%	50,0%	46,15%	53,85%
30-49 god	10/16	6/16	17/31	14/31	/	/	2/9	7/9	4/5	1/5	33/61	28/61
	62,5%	37,5%	54,84%	45,16%			22,22%	77,78%	80,0%	20,0%	54,10%	45,90%
≥50 god	14/21	7/21	30/41	11/41	1/1	/	1/3	2/3	4/4	/	50/70	20/70
	66,67%	33,33%	73,17%	26,83%	100,0%		33,33%	66,67%	100,0%		71,43%	28,57%
Ukupno	67/289	222/289	100/231	131/231	3/23	20/23	22/134	112/134	14/32	18/32	206/709	503/709
	23,18%	76,82%	43,29%	56,71%	13,04%	86,96%	16,42%	83,58%	43,75%	56,25%	29,06%	70,94%

broj pozitivnih/broj ispitanih

% pozitivnih

U tabeli 42 vidi se da je obolevanje u sklopu epidemijske pojave dijarealnog sindroma utvrđeno kod 206 bolesnika (29,06%) od 709 obolelih sa dokazanim nekim od četiri virusa, uzročnika dijarealnog sindroma u petogodišnjem periodu. Virusni gastroenterokolitis kao sporadična infekcija dokazan je kod 503 bolesnika (70,94%). Prikazana je za svaki od virusa učestalost epidemijskog i sporadičnog javljanja bolesti prema starosnim grupama obolelih.



Grafikon 18. Učestalost epidemijskog i sporadičnog javljanja virusnog gastroenterokolitisa prema uzročniku

Tabela 43. Prikaz epidemijskog javljanja virusnih gastroenterokolitisa prema uzročniku

	N	%
ROTA	67	34,9
NORO	100	52,1
ASTRO	3	1,6
ADENO	22	11,5
UKUPNO	192	100,0

Obrađeni rezultati, prikazani u tabeli 43 i grafikonu 18, pokazuju da je norovirus statistički značajno najčešće bio uzročnik epidemija na pregledanom uzorku u petogodišnjem periodu ($\chi^2=120,125$; $p=0,000$). U ove rezultate nisu uvršteni oboleli u epidemijama, gde su kao uzročnici

utvrđena 2 virusa. Međutim, i u ovoj kategoriji udruženih infekcija, norovirus je bio prisutan u svakom uzorku stolice.

Statistički značajno češće su sporadične infekcije bile utvrđene kod dece mlađe od 5 godina u odnosu na epidemijsko javljanje bolesti ($\chi^2=131,965$; $p=0,000$). Ovaj podatak je utvrđen analiziranjem svih dobnih grupa bolesnika zajedno (broj sporadičnog javljanja bolesti kod dece mlađe od 5 godina u odnosu na ukupan broj sporadičnih infekcija – 315/503 –62,6%).

Kada posmatramo svaku dobnu grupu pojedinačno, kod dece uzrasta do 5 godina, ali i kod dece stare 6 do 14 godina statistički značajno češće je bilo sporadično javljanje bolesti od epidemijskog. U najstarijoj grupi obolelih, starih 50 i više godina, statistički značajno je bilo češće epidemijsko javljanje bolesti. U ostalim starosnim grupama obolelih nije bilo statistički značajnih razlika u učestalosti sporadičnog i epidemijskog javljanja oboljenja (tabela 44).

Tabela 44 Epidemijsko i sporadično javljanje virusnih gastroenterokolitisa prema starosnim grupama obolelih

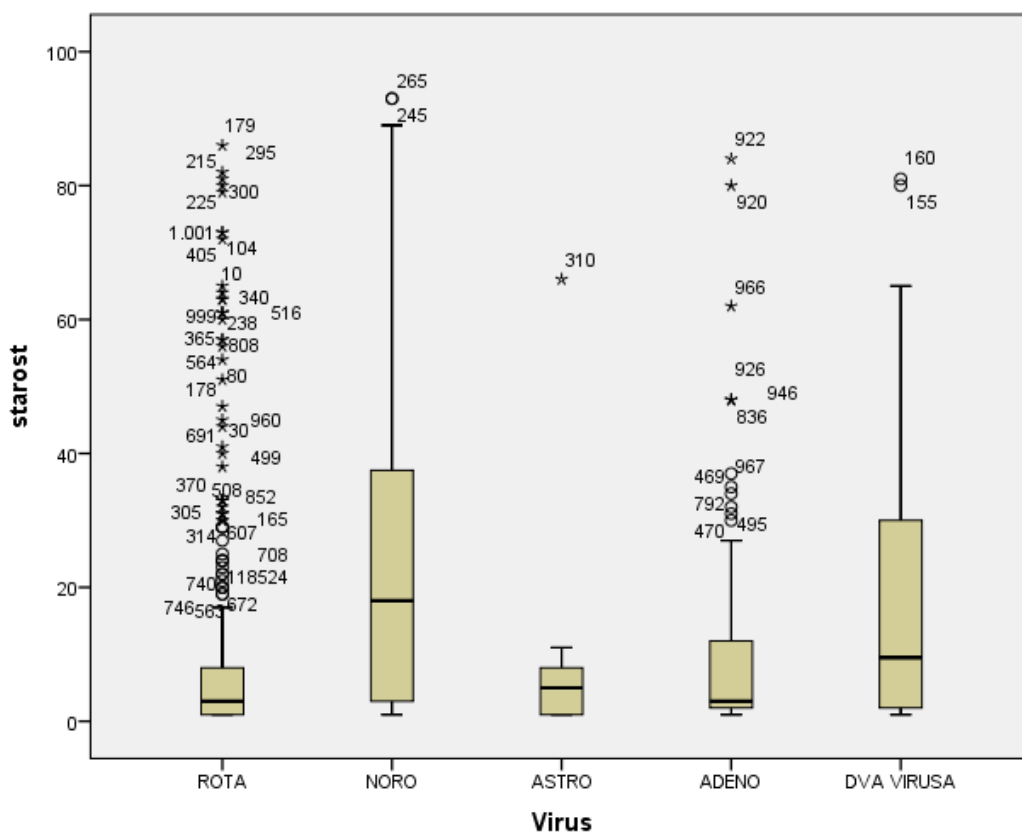
	sporadično		epidemijski		Ukupno		χ^2	p	
	N	%	N	%	N	%			
0-5	315	86,30%	50	13,70%	365	100,0%	192,397	0,000	
6-14	83	73,45%	30	26,55%	113	100,0%	24,858	0,000	
15-19	22	62,86%	13	37,14%	35	100,0%	2,314	0,128	
Starosne grupe	20-29	35	53,85%	30	46,15%	65	100,0%	0,385	0,535
	30-49	28	45,90%	33	54,10%	61	100,0%	0,410	0,522
	≥ 50	20	28,57%	50	71,43%	70	100,0%	12,857	0,000
	Ukupno	503	70,94%	206	29,06%	709	100,0%		

Nakon urađenih analiza kod ukupnog broja obolelih sa dokazanom infekcijom rota, noro, astro i enteričnim adenovirusima, analizom varijansi (ANOVA) dokazana je statistički značajna razlika u starosti obolelih od različitih virusa (ANOVA; $F=6,086$; $p=0,000$). Bonferroni post hoc testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u uzrastu kod obolelih od noro i rotavirusa ($p=0,000$), noro i astrovirusa ($p=0,001$), noro i adenovirusa ($p=0,000$). Poređenjem starosti obolelih

od rota i norovirusa, noro i astrovirusa, kao i noro i adenovirusa utvrđeno je da su prosečno najstariji oboleli od virusnog dijarealnog sindroma bili sa norovirusnom infekcijom.

Tabela 45. Analiza starosti obolelih sa dokazanim virusnim infekcijama

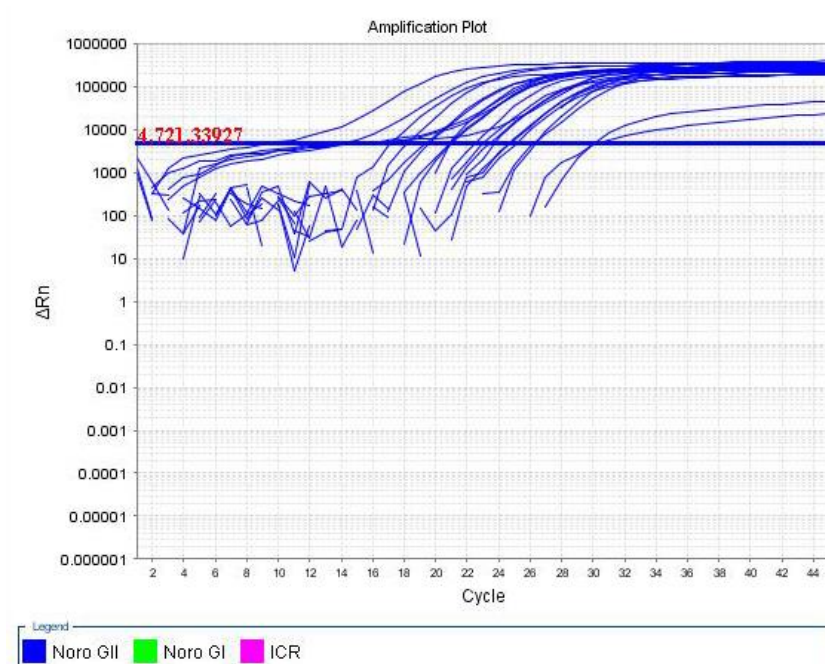
	N	Prosek	SD	95% Interval poverenja		Minimum	Maximum
				donja granica	gornja granica		
ROTA	289	10,94	18,342	8,82	13,06	1	86
NORO	231	25,32	25,745	21,99	28,66	1	93
ASTRO	23	7,39	13,238	1,67	13,12	1	66
ADENO	134	9,68	14,482	7,20	12,15	1	84
DVA VIRUSA	32	20,16	23,396	11,72	28,59	1	81
Ukupno	709	15,69	21,690	14,09	17,29	1	93



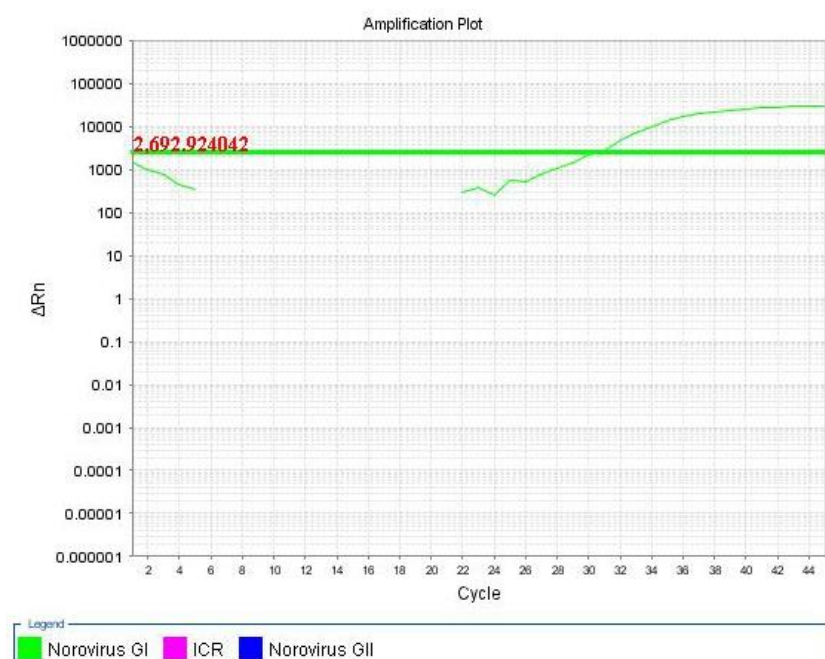
Grafikon 19. Prikaz starosti obolelih sa dokazanim virusnim infekcijama

6.6. Rezultati određivanja genogrupa norovirusa i rotavirusa

Detaljnijom analizom dokazanih norovirusa kod bolesnika iz Vojvodine utvrđenih u ovom istraživanju, dokazano je da samo jedan uzorak pripada genogrupa I (GI), dok ostali pripadaju genogrupu II (GII). Na slici 19 su prikazani neki od rezultata detekcije norovirusa GII metodom *real-time RT-PCR*, dok se na slici 20 vidi detekcija *real-time RT-PCR* testom jedinog uzorka norovirusa GI.

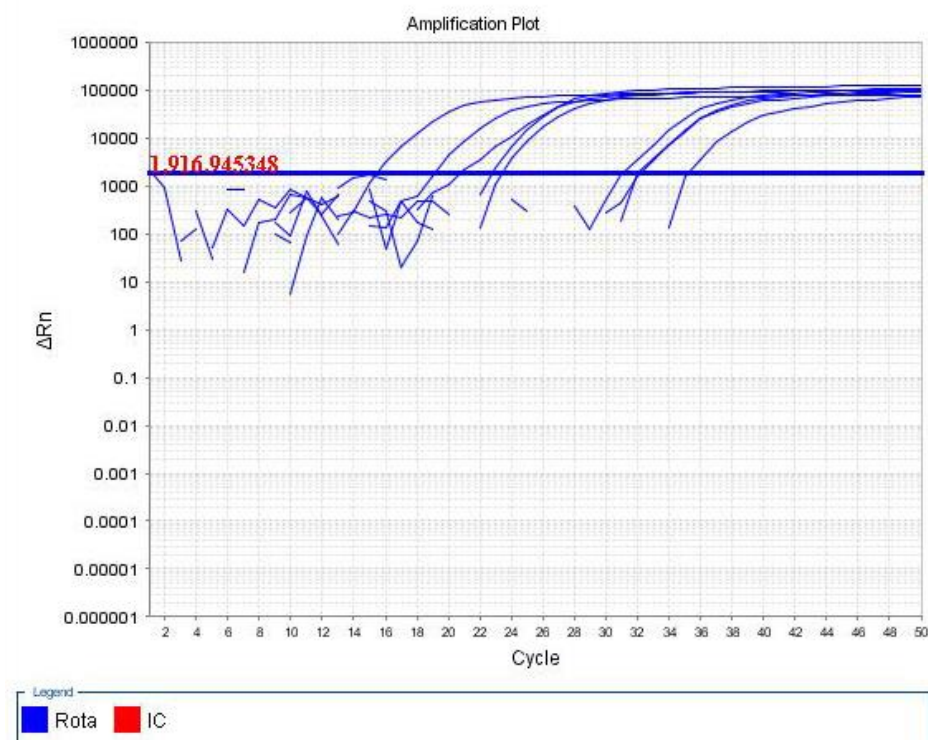


Slika 19. Detekcija Norovirusa GII u uzorcima stolice metodom *real-time RT-PCR*



Slika 20. Detekcija Norovirusa GI u uzorcima stolice metodom *real-time RT-PCR*

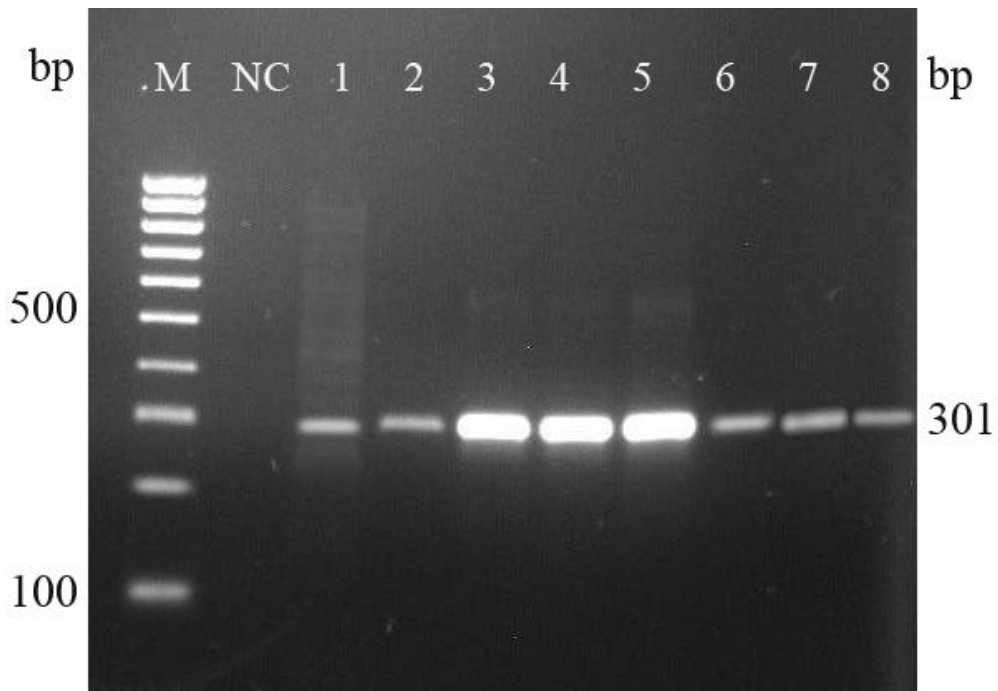
Zbog detaljnije analize dokazanih rotavirusa kod bolesnika iz Vojvodine rađeno je utvrđivanje pripadnosti grupi A, jer je više od 90% rotavirusnih infekcija u svetu izazvano rotavirusima iz grupe A. Svi uzorci pripadali su grupi A rotavirusa. Na slici 21 prikazani su neki od rezultata detekcije grupe A rotavirusa metodom *real-time RT-PCR*.



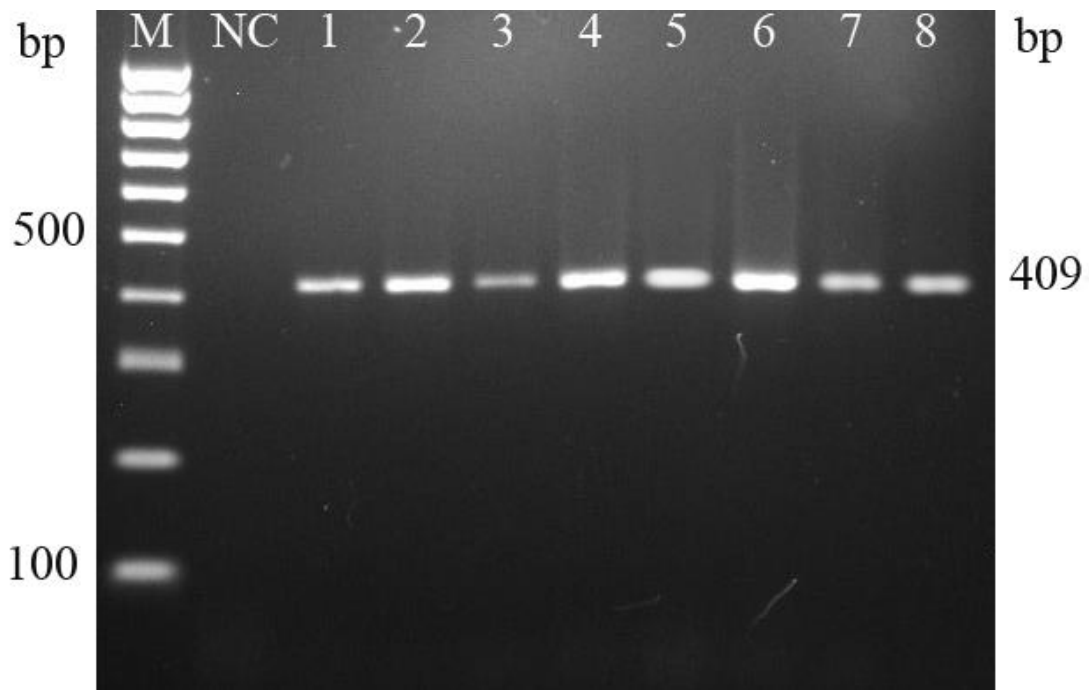
Slika 21. Detekcija Rotavirusa grupe A u uzorcima stolice metodom *real-time RT-PCR*

6.7. Rezultati analize PCR produkata

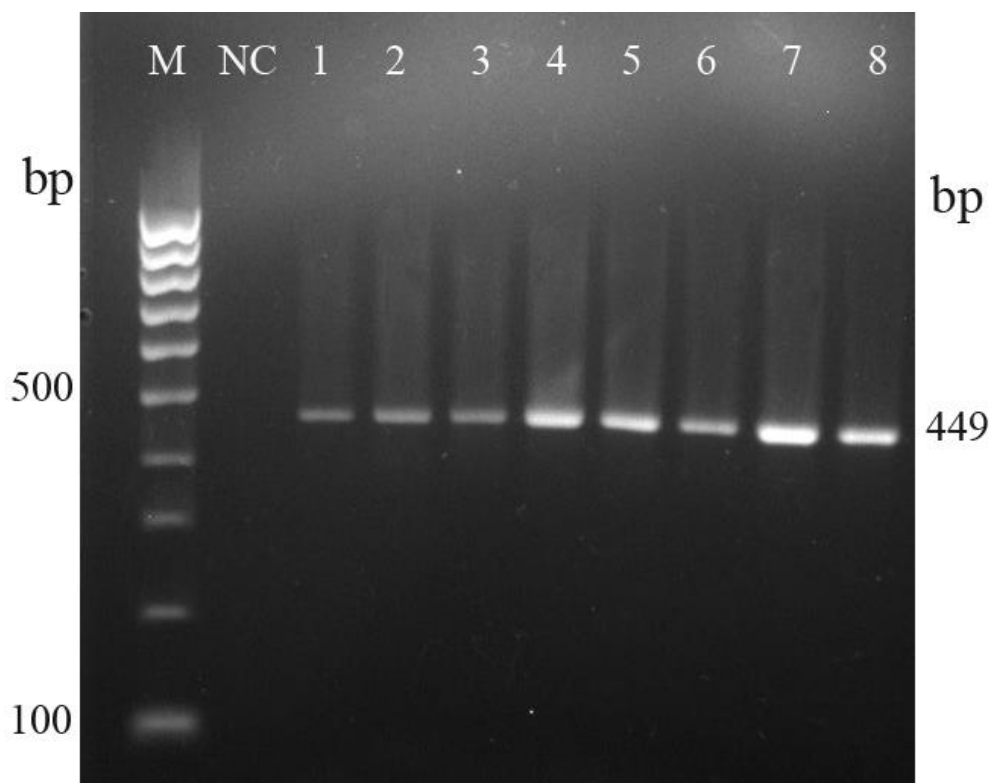
Analiza PCR produkata za adenovirus (gena za hekson), za astrovirus (stabilan region ORF1b - RNK polimeraza i 5' kraj ORF2 regiona), za norovirus (C region - 5' kraj ORF2) i za rotavirus (gena 9 i 4) izvršena je na osnovu rezultata gel elektroforeze. Veličina dobijenih PCR produkata određena je poređenjem sa DNK standardom (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific*), koji sadrži smešu DNK fragmenata različite dužine. Izolati u kojima je utvrđeno prisustvo PCR produkata odgovarajuće dužine korišćeni su u daljem postupku sekvenciranja.



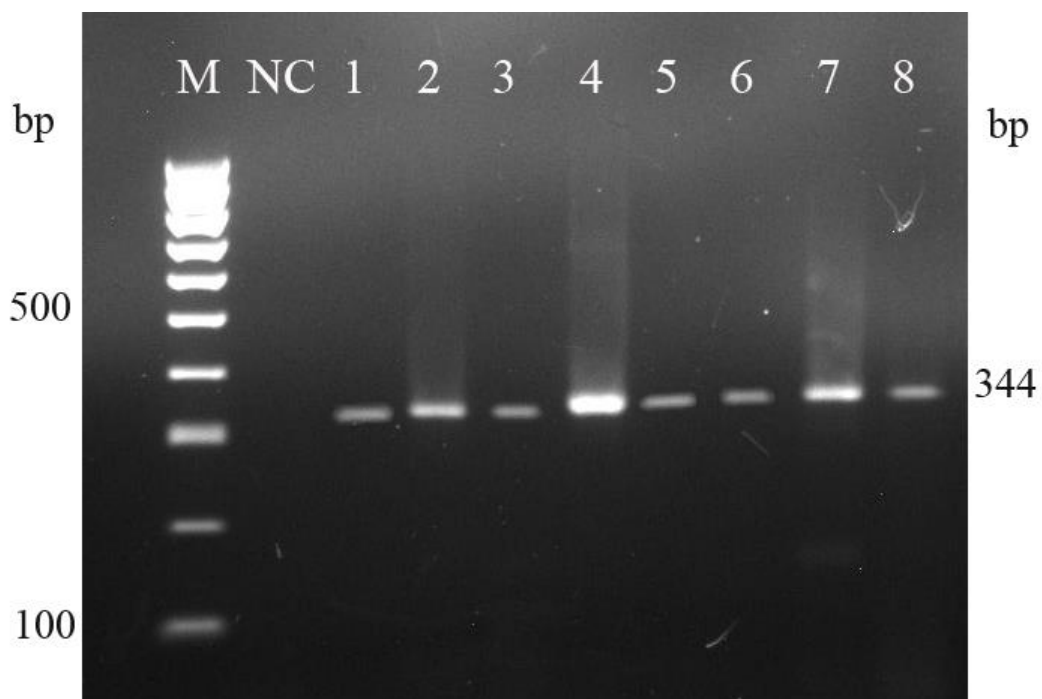
Slika 22. Gel elektroforeza za gen heksona adenovirusa.
 (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), NC (Negativna kontrola), reprezentativni uzorci: 1-8



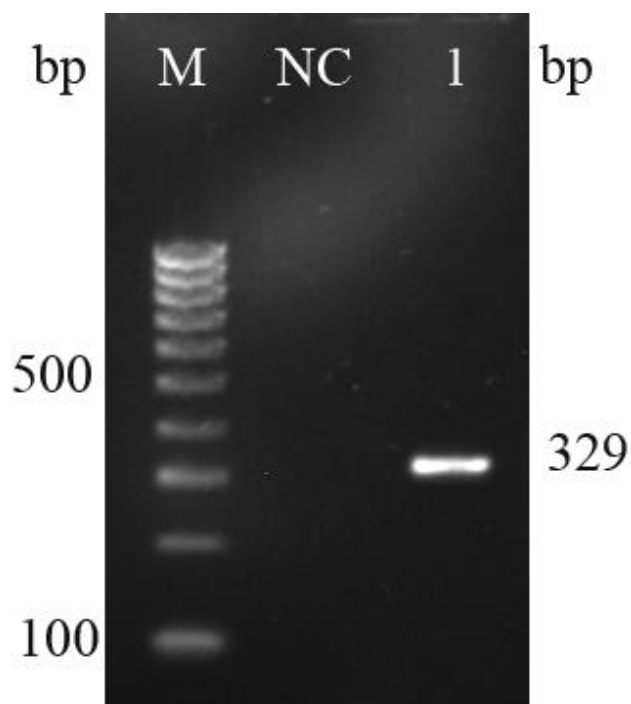
Slika 23. Gel elektroforeza za region ORF1b (RNK polimeraza).
 (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), NC (Negativna kontrola), reprezentativni uzorci: 1-8



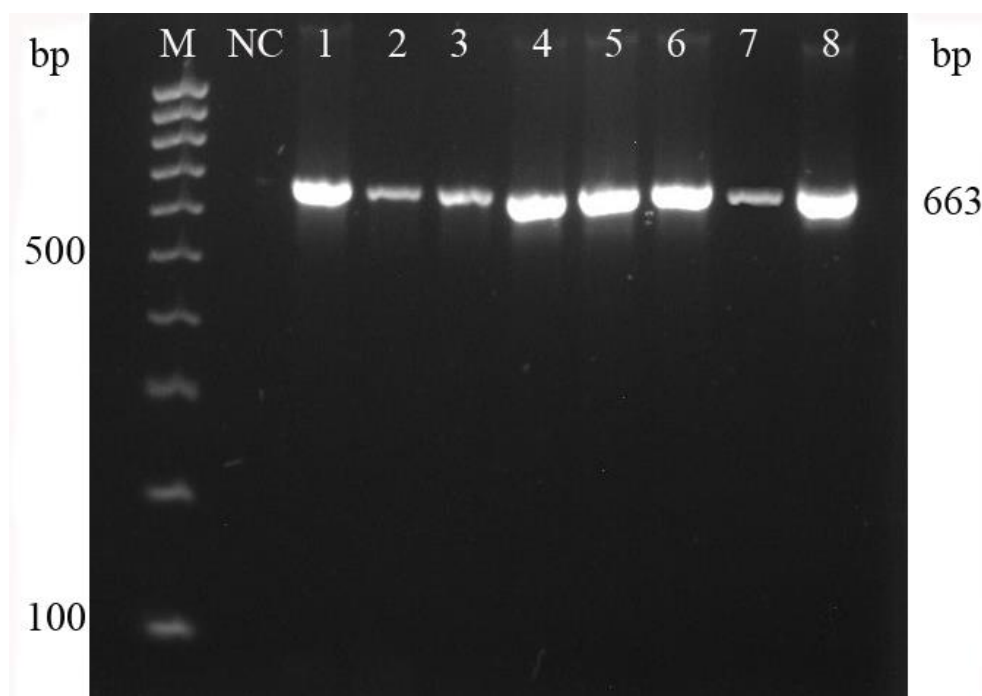
Slika 24. Gel elektroforeza za 5' kraj ORF2 regiona astrovirusa. (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), NC (Negativna kontrola), reprezentativni uzorci: 1-8



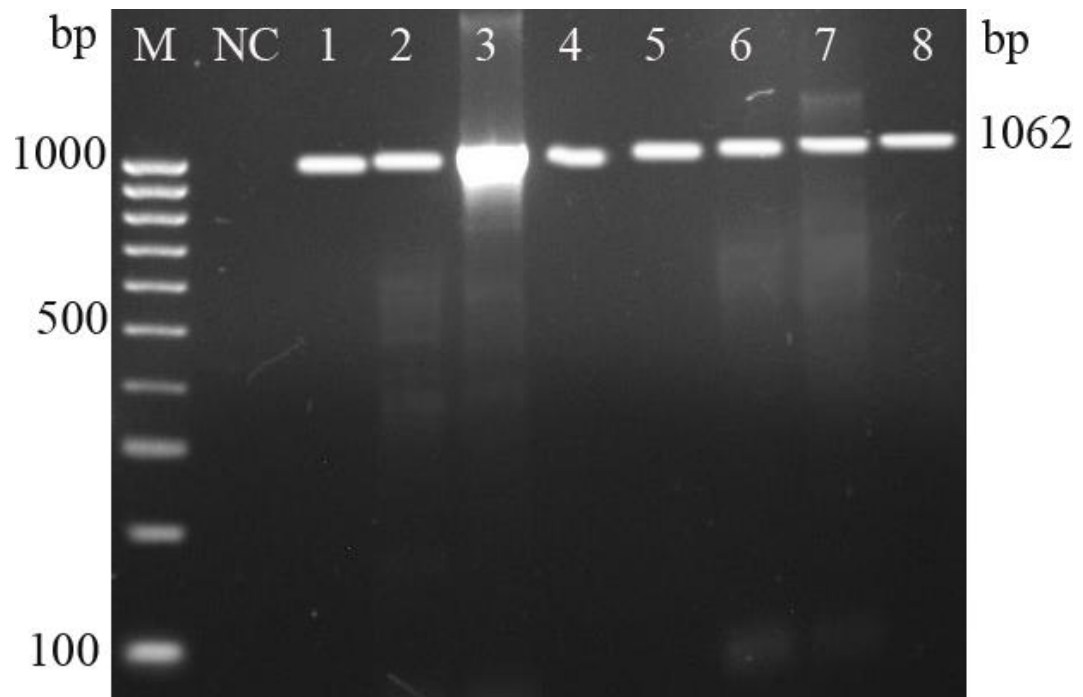
Slika 25. Gel elektroforeza za C region (5'kraj ORF2) genogrupe II norovirusa. (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), NC (Negativna kontrola), reprezentativni uzorci: 1-8



Slika 26. Gel elektroforeza za C region (5'kraj ORF2) genogrupe I norovirusa. (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), NC (Negativna kontrola), reprezentativni uzorak: 1



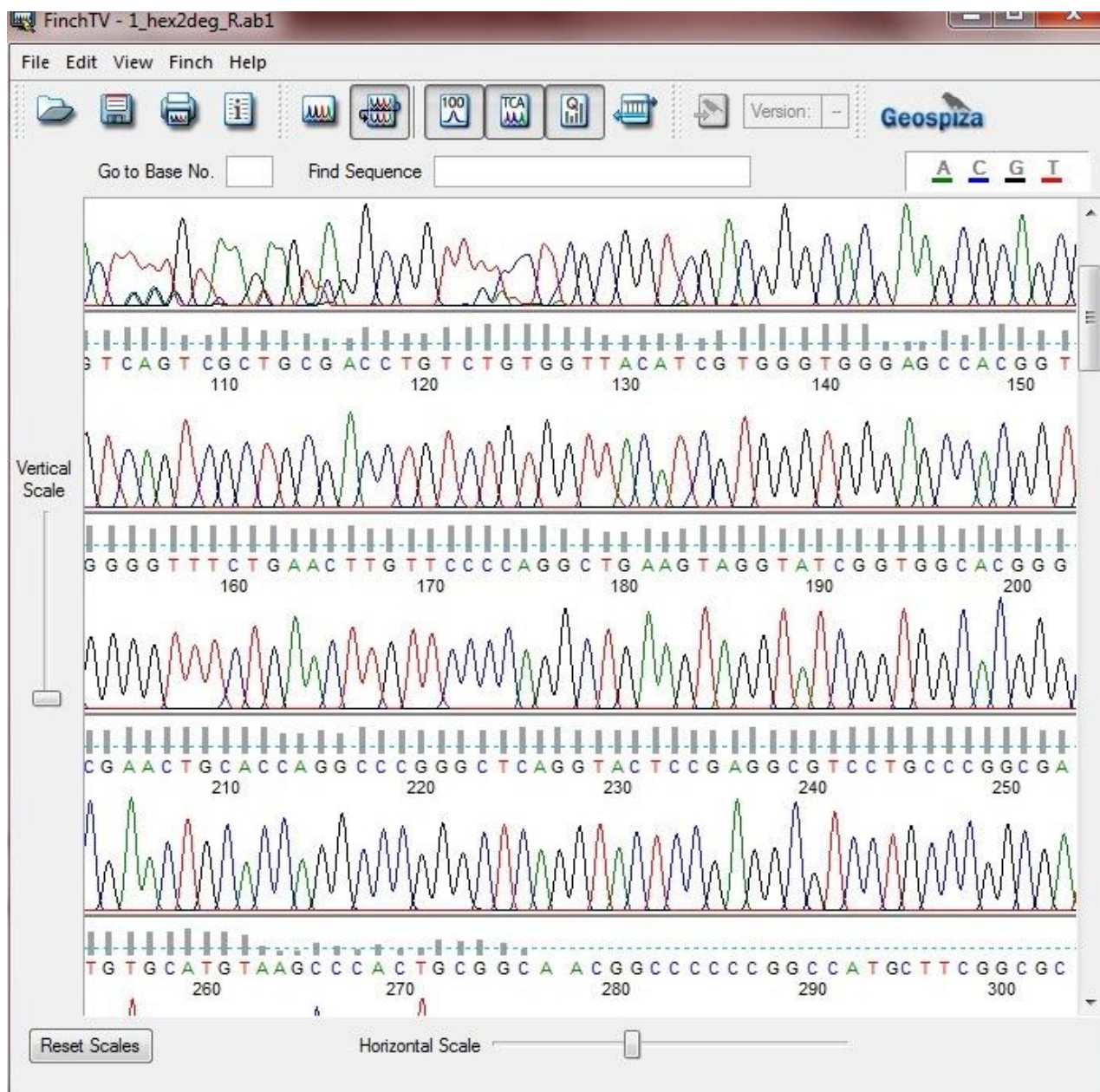
Slika 27. Gel elektroforeza za gen 4 rotavirusa. (M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), NC (Negativna kontrola), reprezentativni uzorci: 1-8



Slika 28. Gel elektroforeza za gen 9 rotavirusa.
(M) marker 100 bp (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo
Fisher Scientific), NC (Negativna kontrola), reprezentativni uzorci: 1-8

6.8. Rezultati sekvenciranja i filogenetske analize

Rezultati sekvenciranja dobijeni su u vidu hromatograma i datoteka u FASTA formatu sa različito obojenim pikovima, gde svaki predstavlja odgovarajući nukleotid na određenom mestu u sekvenci (slika 29).

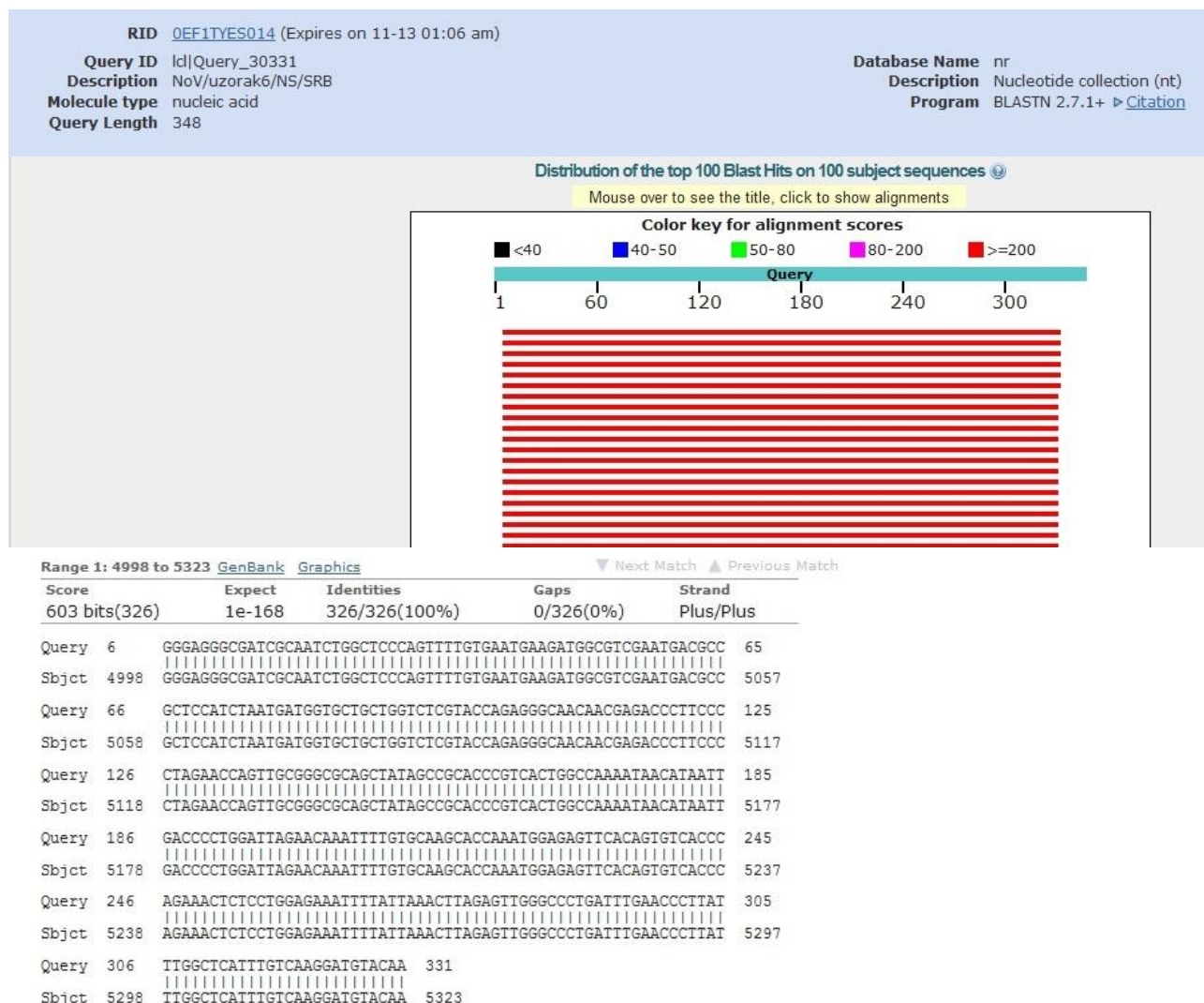


Slika 29. Hromatogram na osnovu analize *reverse* sekvence adenovirusnog hekson gena (FinchTV)

Radi dobijanja kompletne (konsenzus) sekvence, izvršeno je međusobno upoređivanje dobijenih sekvenci u 5' i 3' pravcu. Upotrebom BLAST programa (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) konsenzus sekvenca je upoređena sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma ispitivanih virusa, dostupnih u NCBI GenBank bazi podataka

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Identifikacija je izvršena poređenjem sa poznatim sekvencama na osnovu više od 95% sličnosti.

Slika 30. Identifikacija dobijenih sekvenci BLAST programom



Slika 31. Upoređivanje dobijene sekvence sa sekvencama u NCBI GenBank bazi podataka

U cilju molekularne karakterizacije ispitivanih virusa (adeno, astro, noro i rotavirusa), koji cirkulišu na području AP Vojvodine, u filogenetsku analizu su bile uključene sekvence izolata ovih virusa iz Evrope i ostalih geografskih područja, kao i referentni sojevi ispitivanih virusa. Nukleotidne sekvence, dobijene u ovom radu, prikazane su u prilogu 2. Sekvence ispitivanih virusa deponovaće se u NCBI GenBank bazu podataka.

6.8.1. Rezultati sekvenciranja dela hekson gena kod adenovirusa

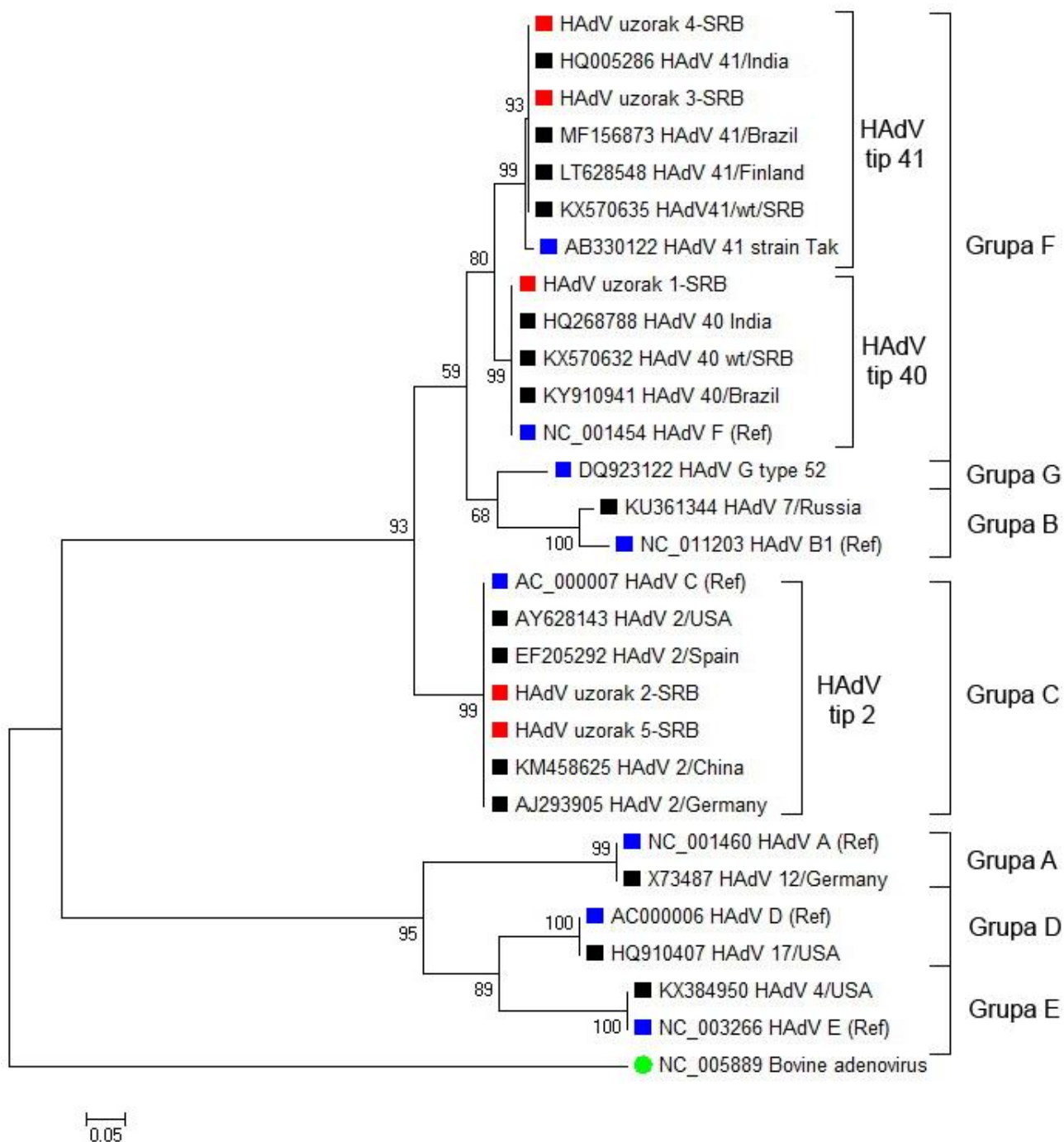
Za potrebe istraživanja u toku ove doktorske disertacije izabrano je 5 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane adenoviruse *real-time PCR* testom. U cilju potvrde tačnosti detekcije virusa u ispitivanim uzorcima *real-time PCR* testom, genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, ovi uzorci su sekvencirani u laboratoriji *Macrogen* u Holandiji. U tabeli 46 prikazani su podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na adenovirus.

Tabela 46. Najvažniji podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na adenovirus

Br. uzorka	Starost/pol	Glavni simptomi/ dužina bolesti	Hospitalizacija /ambulantno	Epidem./sporad. javljanje	Serotip/ grupa
1.	2g./žensko	Dijareja/ 4 dana	Ambulantno	Sporadično	40/F
2.	1g./muško	Dijareja,povraćanje/ 5 dana	Hospitalizacija	Sporadično	2/C
3.	3g./žensko	Dijareja,povraćanje, temp./10 dana	Hospitalizacija	Sporadično	41/F
4.	<1 mesec/ žensko	Dijareja,temp./ 3 dana	Hospitalizacija	Epidemijsko	41/F
5.	<1g./žensko	Dijareja,povraćanje/ 5 dana	Hospitalizacija	Sporadično	2/C

Amplifikovani deo genoma hekson gena za adenoviruse je dužine 301 bp. Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvence dva izolata HAdV iz uzoraka stolice obolelih (izolati označeni brojevima 3 i 4 na tabeli 46), pripadaju HAdV tipu 41. Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Tak (GenBank accession no. AB330122) potvrđeno je da nukleotidne sekvence uzoraka 3 i 4 iz ovog istraživanja pripadaju grupi F i tipu 41. Sekvence uzoraka 3 i 4 HAdV pokazale su 100% sličnost sa sekvencom HAdV 41 izolovanom iz reke Dunav u Novom Sadu (GenBank accession no. KX570635), sekvencom HAdV 41 izolovanom iz stolice dece u Brazilu (GenBank accession no. MF156873) i sekvencom HAdV 41 izolovanom u Finskoj

(GenBank accession no. LT628548), kao i 99% sličnost sa sekvencom HAdV izolovanom iz stolice dece u Indiji (GenBank accession no. HQ005286). Sekvenca HAdV uzorka 1 iz stolice obolelog deteta utvrđeno je da pripada HAdV tipu 40 na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom HAdV F (GenBank accession no. NC_001454). Takođe, sekvenca uzorka 1 HAdV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom HAdV 40 izolovanom iz jezera Palić u Vojvodini (GenBank accession no. KX570632), sekvencom HAdV 40 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Indiji (GenBank accession no. HQ268788) i sekvencom HAdV 40 izolovanom iz stolice dece u Brazilu (GenBank accession no. KY910941). Sekvence dva izolata HAdV iz uzoraka stolice obolelih, označene brojevima 2 i 5, pripadaju HAdV tipu 2. Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom HAdV C (GenBank accession no. AC_000007) potvrđeno je da sekvence uzoraka 2 i 5 iz ovog istraživanja pripadaju grupi C i tipu 2. Isto tako, sekvence uzoraka 2 i 5 HAdV pokazale su 100% sličnost sa sekvencom HAdV 2 izolovanom u SAD-u (GenBank accession no. AY628143), kao i 99% sličnost sa sekvencom HAdV 2 izolovanom u Španiji (GenBank accession no. EF205292), sekvencom HAdV 2 izolovanom u Nemačkoj (GenBank accession no. AJ293905) i sekvencom HAdV 2 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KM458625). Dobijene HAdV sekvence u ovom istraživanju su upoređene i sa sekvencama referentnih sojeva drugih grupa humanih adenovirusa (HAdV A, HAdV B, HAdV C, HAdV D, HAdV E i HAdV G). Poređenjem dobijenih sekvenci sa 24 sekvence HAdV iz GenBank baze podataka (izolati najbliži u BLAST-u, kao i sekvence referentnih izolata) formirano je filogenetsko stablo (slika 32). Referentni izolat za goveđi adenovirus (GenBank accession no. NC_005889) korišćen je kao *outgroup*.



Slika 32. Molekularna filogenetska analiza dokazanih HAdV

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja; ■ nukleotidne sekvence HAdV iz Srbije, ■ referentni izolati; ■ Bovine adenovirus koji je korišćen kao *outgroup*.

6.8.2. Rezultati sekvenciranja dela ORF2 kod astrovirusa

Za potrebe sekvenciranja umnožen je *PCR* reakcijom veoma stabilan region ORF1b (RNK polimeraza) astrovirusa, dužine 409 bp. Ovaj region je stabilan kod svih humanih i animalnih astrovirusa, pa se prajmeri SF0073 i SF0074 smatraju konsenzus prajmerima i omogućili su potvrdu identifikacije svih astrovirusa, izvršene *real-time RT-PCR* testom. Takođe, za detaljniju diferencijaciju, kao i za potrebe sekvenciranja umnožen je *PCR* reakcijom stabilan 5' region ORF2, dužine 449 bp kod klasičnih astrovirusa, koji su i najučestaliji kao uzročnici infekcija kod ljudi. Pošto su kod svih astro pozitivnih obolelih osoba u ovom istraživanju dokazani samo klasični astrovirusi, odlučeno je da se na sekvenciranje u *Macrogen* u Holandiji pošalju samo sekvence 5' regiona ORF2, koje se koriste za razlikovanje i identifikaciju klasičnih astrovirusa kod ljudi.

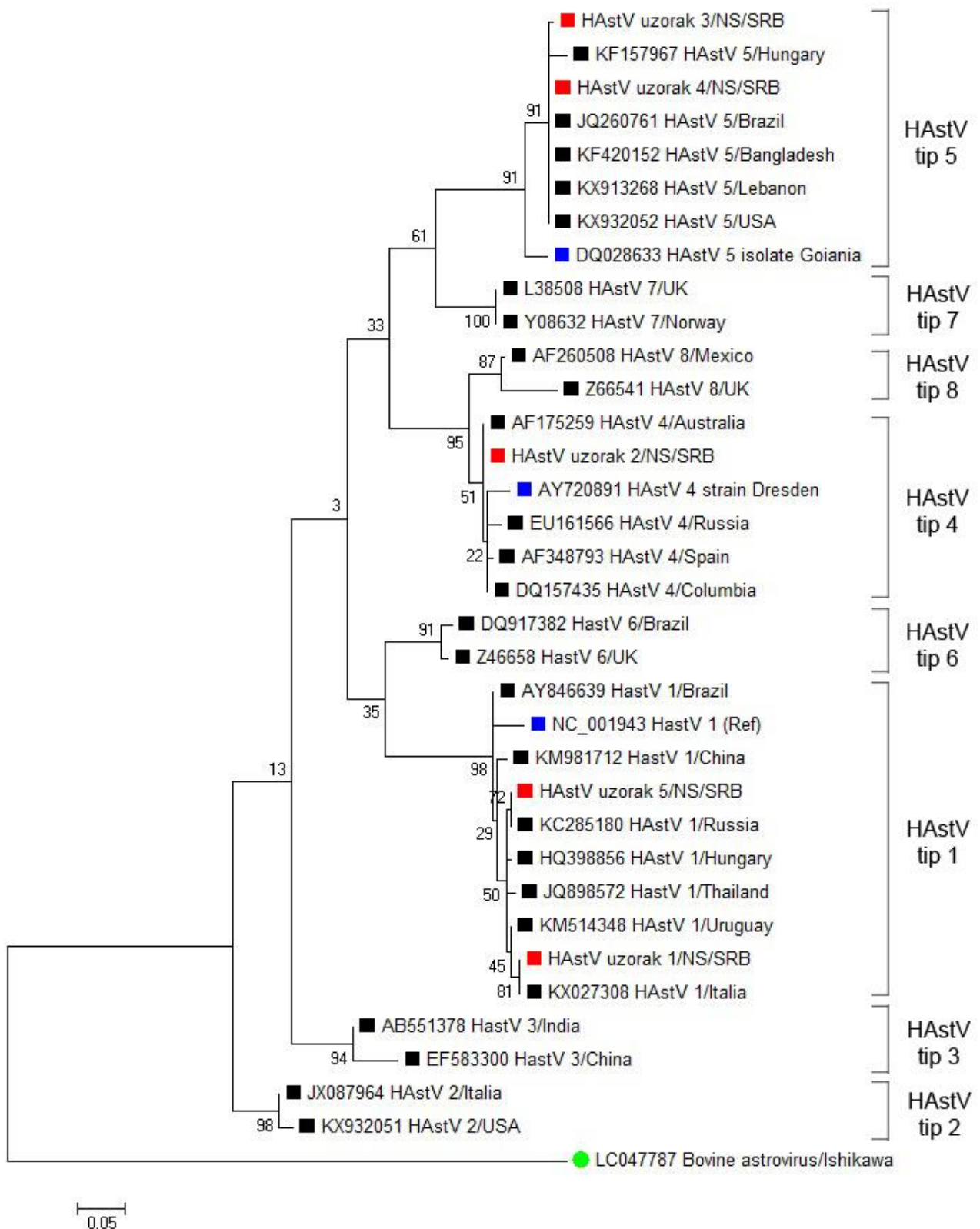
Za potrebe istraživanja u toku ove doktorske disertacije izabrano je 5 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane astroviruse *real-time RT-PCR* testom. U cilju potvrde tačnosti detekcije virusa u ispitivanim uzorcima *real-time RT-PCR* testom, genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, ovi uzorci su sekvencirani u laboratoriji *Macrogen* u Holandiji. U tabeli 47 prikazani su podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na astrovirus..

Tabela 47. Najvažniji podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na astrovirus

Br. uzorka	Starost/pol	Glavni simptomi/ dužina bolesti	Hospitalizacija /ambulantno	Epidem./sporad. javljanje	Grupa/genotip
1.	8g./muško	Dijareja, abdom. grčevi/ 5 dana	Hospitalizacija	Epidemijsko	klasični/ 1
2.	2g./muško	Dijareja/ 5 dana	Ambulantno	Sporadično	klasični/ 4
3.	6g./muško	Dijareja,povraćanje, temp./3 dana	Hospitalizacija	Sporadično	klasični/ 5
4.	8g./žensko	Dijareja,povraćanje, temp./ 7 dana	Hospitalizacija	Sporadično	klasični/ 5
5.	2g./žensko	Dijareja,temp/ 3 dana	Hospitalizacija	Sporadično	klasični/ 1

Amplifikovani stabilan 5' region ORF2 je dužine 449 bp kod klasičnih astrovirusa. ORF2 region kodira strukturni protein kapsida astrovirusa. Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvence dva izolata HAstV iz uzoraka stolice obolele dece (izolati označeni brojevima 1 i 5 na tabeli 47), pripadaju grupi klasičnih HAstV tipa 1. Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom HAstV 1 (GenBank accession no. NC_001943), potvrđeno je da nukleotidne sekvence uzoraka 1 i 5 iz ovog istraživanja pripadaju grupi klasičnih HAstV i tipu 1. Sekvenca uzorka 1 HAstV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Italiji

(GenBank accession no. KX027308), 99% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Urugvaju (GenBank accession no. KM514348), kao i 97% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KM981712) i sekvencom HAstV 1 izolovanom kod dece sa gastroenteritisom u Tajlandu (GenBank accession no. JQ898572). Sekvenca uzorka 5 HAstV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Urugvaju (GenBank accession no. KM514348), sekvencom HAstV 1 izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. KC285180), 98% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KM981712), kao i 97% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Mađarskoj (GenBank accession no. HQ398856) i sekvencom HAstV 1 izolovanom u Brazilu (GenBank accession no. AY846639). Sekvenca HAstV uzorka 2 iz stolice obolelog deteta utvrđeno je da pripada grupi klasičnih HAstV i tipu 4 na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Dresden (GenBank accession no. AY720891). Sekvenca uzorka 2 HAstV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom HAstV 4 izolovanom u Španiji (GenBank accession no. AF348793), sekvencom HAstV 4 izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. EU161566), sekvencom HAstV 4 izolovanom u Kolumbiji (GenBank accession no. DQ157435) i sekvencom HAstV 4 izolovanom u Australiji (GenBank accession no. AF175259). Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Goiania (GenBank accession no. DQ028633) potvrđeno je da sekvence uzoraka 3 i 4 iz ovog istraživanja pripadaju klasičnom HAstV i tipu 5. Sekvenca uzorka 3 HAstV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom HAstV 5 izolovanom kod dece u Brazilu (GenBank accession no. JQ260761), sekvencom HAstV 5 izolovanom u SAD-u (GenBank accession no. KX932052), sekvencom HAstV 5 izolovanom u Bangladešu (GenBank accession no. KF420152), sekvencom HAstV 5 izolovanom kod hospitalizovane dece u Libiji (GenBank accession no. KX913268), kao i 98% sličnost sa sekvencom HAstV 5 izolovanom kod starijih osoba u Mađarskoj (GenBank accession no. KF157967). Sekvenca uzorka 4 HAstV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom HAstV 5 izolovanom kod dece u Brazilu (GenBank accession no. JQ260761), sekvencom HAstV 5 izolovanom kod hospitalizovane dece u Libiji (GenBank accession no. KX913268), kao i 99% sličnost sa sekvencom HAstV 5 izolovanom kod starijih osoba u Mađarskoj (GenBank accession no. KF157967), sekvencom HAstV 5 izolovanom u SAD-u (GenBank accession no. KX932052) i sekvencom HAstV 5 izolovanom u Bangladešu (GenBank accession no. KF420152). Dobijene HAstV sekvence u ovom istraživanju su upoređene sa 30 sekvenci HAstV iz GenBank baze podataka (izolati najbliži u BLAST-u, kao i sekvence referentnih izolata) i formirano je filogenetsko stablo (slika 33). Referentni izolat za goveđi astrovirus (GenBank accession no. LC047787) korišćen je kao *outgroup*.



Slika 33. Molekularna filogenetska analiza dokazanih HAstV

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja; ■ nukleotidne sekvence HAstV iz Srbije, ■ referentni izolati; ● Bovine astrovirus koji je korišćen kao *outgroup*.

6.8.3. Rezultati sekvenciranja dela ORF2 kod norovirusa

Od 231 pozitivne osobe na norovirus utvrđene u istraživanju tokom ove doktorske disertacije, kod samo jedne osobe dokazana je genogrupa I, a kod ostalih je utvrđena genogrupa II norovirusa. Izabrano je 10 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane noroviruse *real-time RT-PCR* testom. U cilju potvrde tačnosti detekcije virusa u ispitivanim uzorcima *real-time RT-PCR* testom, genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, ovi uzorci su sekvencirani u laboratoriji *Macrogen* u Holandiji. U tabeli 48 prikazani su podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na norovirus.

Tabela 48. Najvažniji podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na norovirus

Br. uzorka	Starost/ pol	Glavni simptomi/ dužina bolesti	Hospitalizacija /ambulantno	Epidem./spasad. javljanje	Grupa/ genotip
1.	5g./muško	Dijareja, abdom.grčevi, povraćanje/ 5 dana	Ambulantno	Sporadično	GI/2
2.	58g./ žensko	Dijareja,povraćanje, temp./3 dana	Hospitalizacija	Epidemijsko	GII/2
3.	77g./ muško	Dijareja,povraćanje, temp./5 dana	Hospitalizacija	Epidemijsko	GII/17
4.	16g./ muško	Dijareja,povraćanje/ 3 dana	Ambulantno	Epidemijsko	GII/1
5.	19g./ žensko	Dijareja,povraćanje, temp./3 dana	Hospitalizacija	Sporadično	GII/1
6.	28g./ žensko	Dijareja,povraćanje, temp./3 dana	Hospitalizacija	Epidemijsko	GII/17
7.	16g./ muško	Dijareja,povraćanje, temp./3 dana	Hospitalizacija	Sporadično	GII/2
8.	2g./muško	Dijareja,povraćanje, temp./4 dana	Hospitalizacija	Sporadično	GII/2
9.	12g./ muško	Dijareja,povraćanje, temp./3 dana	Hospitalizacija	Sporadično	GII/4
10.	1g./muško	Dijareja,povraćanje, temp./7 dana	Hospitalizacija	Epidemijsko	GII/2

Amplifikovani C region (5' kraj) ORF2 dela genoma norovirusa je dužine oko 300 bp (329 bp kod GI i 343 bp kod GII). ORF2 region kodira glavni protein kapsida VP1 kod norovirusa. Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvenca izolata NoV iz uzorka stolice obolelog deteta, označenog brojem 1, pripada NoV GI i tipu 2. Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Southampton virus (GenBank accession no. L07418.1), potvrđeno je da nukleotidna sekvenca uzorka 1 iz ovog istraživanja pripada genogrubi I NoV i tipu 2. Sekvenca uzorka 1 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GI.2 izolovanom kod odraslih osoba sa

gastroenteritisom u Kini (GenBank accession no. KM462611), sekvencom NoV GI.2 izolovanom kod obolele dece u Grčkoj (GenBank accession no. KU821055), kao i 97% sličnost sa sekvencom NoV GI.2 u Belgiji (GenBank accession no. FJ515294).

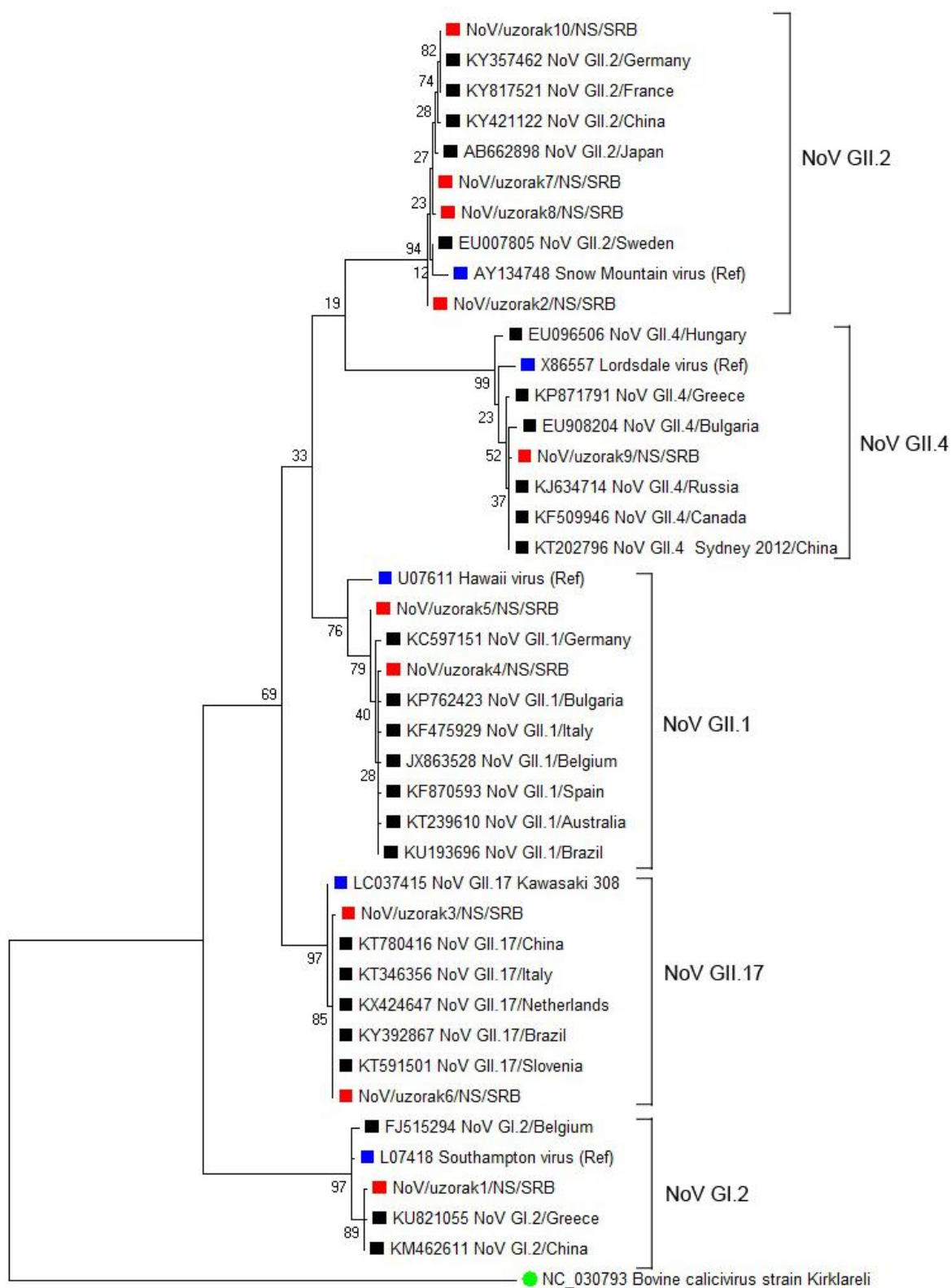
Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Hawaii virus (GenBank accession no. U07611) potvrđeno je da sekvence uzoraka 4 i 5 iz ovog istraživanja pripadaju genograpi II NoV i tipu 1. Sekvenca uzorka 4 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom kod osoba sa gastroenteritisom u Bugarskoj (GenBank accession no. KP762423), sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Belgiji (GenBank accession no. JX863528), sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Italiji (GenBank accession no. KF475929), sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Španiji (GenBank accession no. KF870593), kao i 97% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Nemačkoj (GenBank accession no. KC597151). Sekvenca uzorka 5 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Brazilu (GenBank accession no. KU193696), kao i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom kod osoba sa gastroenteritisom u Bugarskoj (GenBank accession no. KP762423), sekvencom NoV GII.1 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Nemačkoj (GenBank accession no. KC597151), sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Australiji (GenBank accession no. KT239610) i sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Italiji (GenBank accession no. KF475929).

Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Snow Mountain virus (GenBank accession no. AY134748) potvrđeno je da sekvence uzoraka 2, 7, 8 i 10 iz ovog istraživanja pripadaju genograpi II NoV i tipu 2. Sekvenca uzorka 2 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Švedskoj (GenBank accession no. EU007805), sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Japanu (GenBank accession no. AB662898), kao i 97% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom kod obolelih od gastroenteritisa u Nemačkoj (GenBank accession no. KY357462) i sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KY421122). Sekvenca uzorka 7 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Švedskoj (GenBank accession no. EU007805), sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Japanu (GenBank accession no. AB662898), kao i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KY421122) i sekvencom NoV GII.2 izolovanom kod obolelih od gastroenteritisa u Nemačkoj (GenBank accession no. KY357462). Sekvenca uzorka 8 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom kod obolelih od gastroenteritisa u Japanu (GenBank accession no. AB662898), kao i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom kod obolelih od gastroenteritisa u Nemačkoj (GenBank accession no. KY357462), sekvencom NoV GII.2 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Švedskoj (GenBank accession no. EU007805) i sekvencom NoV GII.2

izolovanom u Kini (GenBank accession no. KY421122). Sekvenca uzorka 10 NoV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Francuskoj (GenBank accession no. KY817521), sekvencom NoV GII.2 izolovanom u obolelih od gastroenteritisa u Nemačkoj (GenBank accession no. KY357462), kao i 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KY421122) i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Japanu (GenBank accession no. AB662898).

Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Lordsdale virus (GenBank accession no. X86557) potvrđeno je da sekvenca uzorka 9 iz ovog istraživanja pripada genograpi II NoV i tipu 4. Sekvenca uzorka 9 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 varijanta Sidnej 2012 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KT202796), 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 izolovanom kod dece sa gastroenteritisom u Rusiji (GenBank accession no. KJ634714), sekvencom NoV GII.4 izolovanom u Grčkoj (GenBank accession no. KP871791), sekvencom NoV GII.4 izolovanom u Kanadi (GenBank accession no. KF509946), 97% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 izolovanom u Bugarskoj (GenBank accession no. EU908204) kao i 95% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. EU096506).

Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom NoV GII.17 Kawasaki (GenBank accession no. LC037415) potvrđeno je da sekvence uzoraka 3 i 6 iz ovog istraživanja pripadaju genograpi II NoV i tipu 17. Sekvenca uzorka 3 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Sloveniji (GenBank accession no. KT591501), sekvencom NoV GII.17 izolovanom u u Brazilu (GenBank accession no. KY392867), sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Holandiji (GenBank accession no. KX424647), sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KT780416) i sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Italiji (GenBank accession no. KT346356). Sekvenca uzorka 6 NoV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Sloveniji (GenBank accession no. KT591501), sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Brazilu (GenBank accession no. KY392867), sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Holandiji (GenBank accession no. KX424647), sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Italiji (GenBank accession no. KT346356) i sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KT780416). Dobijene NoV sekvence u ovom istraživanju su upoređene sa 32 sekvence NoV iz GenBank baze podataka (izolati najbliži u BLAST-u, kao i sekvence referentnih izolata) i formirano je filogenetsko stablo (slika 34). Referentni izolat za goveđi norovirus (GenBank accession no. NC_030793.1) korišćen je kao *outgroup*.



Slika 34. Molekularna filogenetska analiza dokazanih NoV

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja;

■ nukleotidne sekvence NoV iz Srbije, ■ referentni izolati; ● Bovine calicivirus, koji je korišćen kao *outgroup*.

6.8.4. Rezultati sekvenciranja gena 4 (VP4) i gena 9 (VP7) kod rotavirusa

Više od 90% rotavirusnih infekcija u svetu izazvano je rotavirusima iz grupe A (RVA). Zbog detaljnije analize dokazanih rotavirusa kod bolesnika iz Vojvodine, rađeno je dokazivanje pripadnosti grupi A. Kod svih uzoraka utvrđeno je da pripadaju grupi A rotavirusa. Za potrebe istraživanja, izabrano je 10 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane rotaviruse *real-time RT-PCR* testom. U cilju potvrde tačnosti detekcije virusa u ispitivanim uzorcima *real-time RT-PCR* testom, genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, ovi uzorci su sekvencirani u laboratoriji *Macrogen* u Holandiji. U tabeli 49 prikazani su podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na rotavirus.

Tabela 49. Najvažniji podaci o bolesnicima sa reprezentativnim uzorcima, pozitivnim na rotavirus

Br. uzorka	Starost/pol	Glavni simptomi/dužina bolesti	Hospitalizacija/ambulantno	Epidem./sporad. javljanje	Grupa/genotip
1.	3g./muško	Dijareja, temp./ 5 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G3P8
2.	2g./žensko	Dijareja, abdom.grčevi, temp./3 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G1P8
3.	86g./žensko	Dijareja,povraćanje/ 5 dana	Hospitalizacija	Epidemijsko	A/G1P8
4.	40g./žensko	Dijareja, abdom.grčevi, povraćanje /3 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G2P4
5.	56g./žensko	Dijareja, abdom.grčevi, povraćanje /4 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G3P8
6.	4g./muško	Dijareja, abdom.grčevi, povraćanje temp./5 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G1P8
7.	2g./žensko	Dijareja /4 dana	Ambulantno	Sporadično	A/G2P4
8.	33g./žensko	Dijareja, abdom.grčevi, povraćanje temp./4 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G9P8
9.	1g./žensko	Dijareja,povraćanje, temp./6 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G2P4
10.	4g./žensko	Dijareja,povraćanje, temp./5 dana	Hospitalizacija	Sporadično	A/G1P8

Amplifikovani deo gena 4 rotavirusa je dužine 663 bp. Gen 4 kodira VP4 protein na površini virusa, na osnovu koga se vršilo određivanje P tipa rotavirusa grupe A (P tipizacija). Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvence izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označene brojem 1, 2, 3, 5, 6, 8 i 10, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu P[8], što je potvrđeno i na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Wa (GenBank accession

no. L34161). Sekvence uzoraka 2 i 10 RVA pokazale su 100% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Turskoj (GenBank accession no. MF494873), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Italiji (GenBank accession no. KF614647), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. KF036131), kao i 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Sloveniji (GenBank accession no. KJ432862), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Belgiji (GenBank accession no. JN849137) i sekvencom RVA P[8] izolovanom u Nemačkoj (GenBank accession no. FJ747616). Sekvence uzoraka 1, 3 i 5 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Španiji (GenBank accession no. KU550285), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Japanu (GenBank accession no. AB975556), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. KU870410), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Australiji (GenBank accession no. KU059791) i sekvencom RVA P[8] izolovanom na Tajlandu (GenBank accession no. JN706174). Sekvenca uzorka 6 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. KF036131), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Italiji (GenBank accession no. KF614647), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Turskoj (GenBank accession no. MF494873), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Nemačkoj (GenBank accession no. FJ747616) i sekvencom RVA P[8] izolovanom u Belgiji (GenBank accession no. JN849137). Sekvenca uzorka 8 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Brazilu (GenBank accession no. KJ454524), sekvencom RVA P[8] izolovanom u SAD-u (GenBank accession no. JF491069), sekvencom RVA P[8] izolovanom u Kini (GenBank accession no. KF371777), kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Španiji (GenBank accession no. KU550285) i sekvencom RVA P[8] izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. KU870410).

Isto tako, na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvence izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 4,7 i 9, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu P[4], što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom DS-1 (GenBank accession no. HQ650119). Sekvenca uzorka 4 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA P[4] izolovanom u Brazilu (GenBank accession no. KJ940113), sekvencom RVA P[4] izolovanom u Kini (GenBank accession no. KU174024), sekvencom RVA P[4] izolovanom u Indiji (GenBank accession no. JX307596) i sekvencom RVA P[4] izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. KX545322). Sekvence uzoraka 7 i 9 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA P[4] izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Italiji (GenBank accession no. KF202512), sekvencom RVA P[4] izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Turskoj (GenBank accession no. MF494861), sekvencom RVA P[4] izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. KJ919709) i sekvencom RVA P[4] izolovanom u Belgiji (GenBank accession no. JN849155). Dobijene sekvence RVA u ovom istraživanju su upoređene sa 25 sekvenci RVA iz GenBank baze podataka

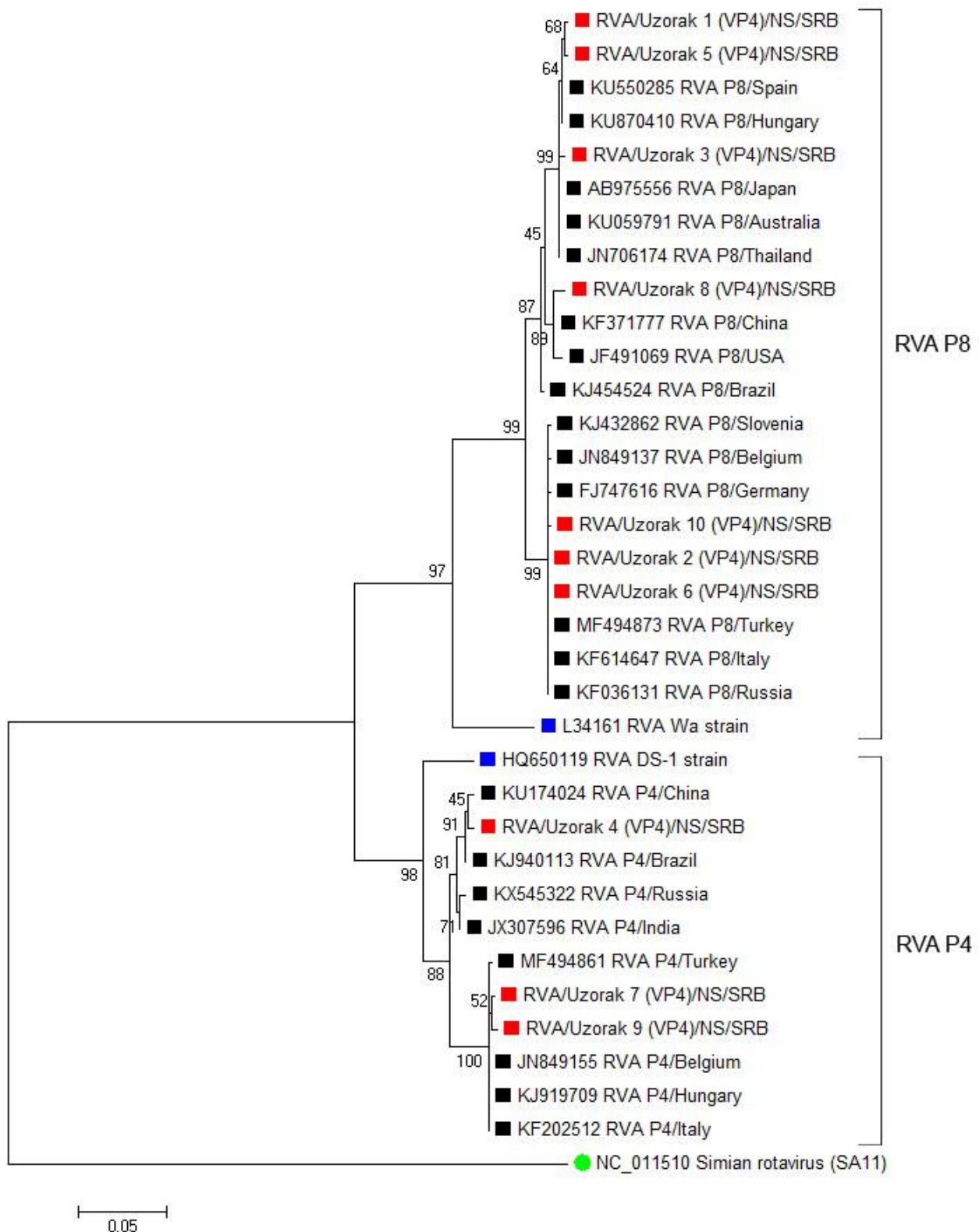
(izolati najbliži u BLAST-u, kao i sekvence referentnih izolata) i formirano je filogenetsko stablo (slika 35). Referentni izolat za majmunski rotavirus (GenBank accession no. NC_011510) korišćen je kao *outgroup*.

Amplifikovani gen 9 rotavirusa je dužine 1062 bp. Gen 9 kodira VP7 protein na površini virusa, na osnovu koga se vršilo određivanje G tipa rotavirusa grupe A (G tipizacija). Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvence izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 2, 3, 6 i 10, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu G1, što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Wa (GenBank accession no. JX406755). Sekvence uzoraka 2 i 6 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Turskoj (GenBank accession no. MF494779), sekvencom RVA G1 izolovanom u Pakistanu (GenBank accession no. JX273716), sekvencom RVA G1 izolovanom kod dece sa gastroenteritisom u Indiji (GenBank accession no. AB546868) i sekvencom RVA G1 izolovanom u SAD-u (GenBank accession no. JX027828). Sekvenca uzorka 3 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Japanu (GenBank accession no. AB975460), sekvencom RVA G1 izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. KX758605), kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Argentini (GenBank accession no. KT948654) i sekvencom RVA G1 izolovanom na Tajlandu (GenBank accession no. LC066655). Sekvenca uzorka 10 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Turskoj (GenBank accession no. MF494779), sekvencom RVA G1 izolovanom kod dece sa gastroenteritisom u Indiji (GenBank accession no. AB546868), kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom na Kubi (GenBank accession no. FJ348350).

Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvence izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 4, 7 i 9, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu G2, što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom DS-1 (GenBank accession no. HQ650124.1). Sekvenca uzorka 4 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G2 izolovanom u SAD-u (GenBank accession no. MF168276), sekvencom RVA G2 izolovanom u Južnoj Koreji (GenBank accession no. HQ425266), kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G2 izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. KJ919920), sekvencom RVA G2 izolovanom kod dece sa gastroenteritisom u Italiji (GenBank accession no. KF414556) i sekvencom RVA G2 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Japanu (GenBank accession no. AF401754). Sekvence uzoraka 7 i 9 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA G2 izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. KJ919920), sekvencom RVA G2 izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. JQ343219), sekvencom RVA G2 izolovanom u Belgiji (GenBank accession no. JN849156) i sekvencom RVA G2 izolovanom u Kini (GenBank accession no. DQ904516).

Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvence izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označene brojem 1 i 5, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu G3, što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom RV3 (GenBank accession no. FJ998278). Sekvenca uzorka 1 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G3 izolovanom u Španiji (GenBank accession no. KU550297), sekvencom RVA G3 izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. KU870415), sekvencom RVA G3 izolovanom u Turskoj (GenBank accession no. MF494838) i sekvencom RVA G3 izolovanom u Japanu (GenBank accession no. KJ639028). Sekvenca uzorka 5 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G3 izolovanom u Nemačkoj (GenBank accession no. KY000546), sekvencom RVA G3 izolovanom u Mađarskoj (GenBank accession no. KU870415), sekvencom RVA G3 izolovanom u Australiji (GenBank accession no. KU059782) i sekvencom RVA G3 izolovanom u Španiji (GenBank accession no. KU550297).

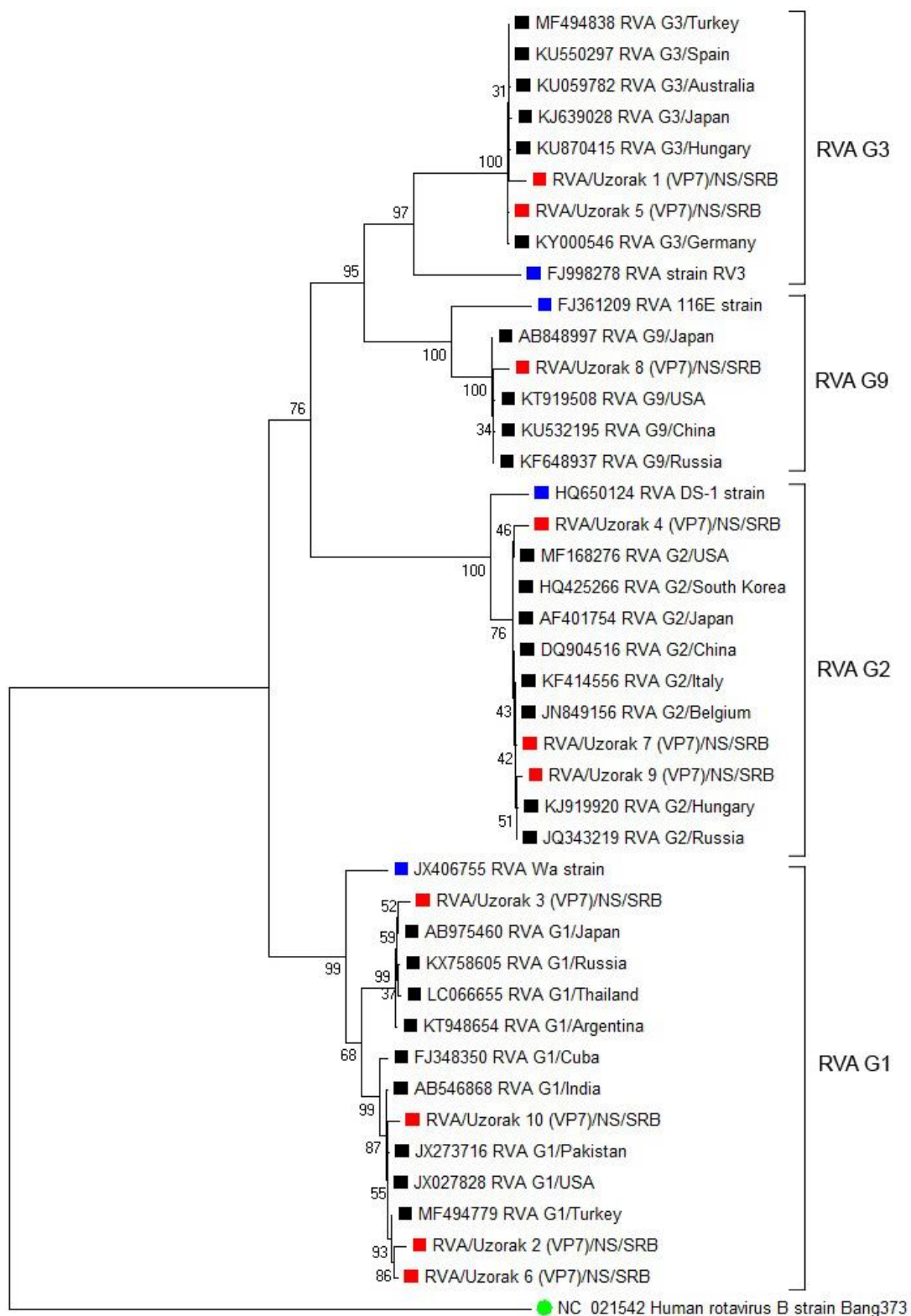
Na osnovu izvršene molekularne tipizacije i filogenetske analize, utvrđeno je da sekvenca izolata RVA iz uzorka stolice obolelih osoba, označenog brojem 8, pripada grupi A rotavirusa i tipu G9, što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom 116E (GenBank accession no. FJ361209). Sekvenca uzorka 8 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G9 izolovanom u Kini (GenBank accession no. KU532195), kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G9 izolovanom u Rusiji (GenBank accession no. KF648937), sekvencom RVA G9 izolovanom u Japanu (GenBank accession no. AB848997) i sekvencom RVA G9 izolovanom u SAD-u (GenBank accession no. KT919508). Dobijene sekvence RVA u ovom istraživanju su upoređene sa 32 sekvence RVA iz GenBank baze podataka (izolati najbliži u BLAST-u, kao i sekvence referentnih izolata) i formirano je filogenetsko stablo (slika 36). Referentni izolat Bang373 za humani rotavirus grupe B (GenBank accession no. NC_021542) korišćen je kao *outgroup*.



Slika 35. Molekularna filogenetska analiza gena 4 dokazanih RVA

Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja;

■ nukleotidne sekvence RVA iz Srbije, ■ referentni izolati; ● Simian rotavirus, koji je korišćen kao *outgroup*.



Slika 36. Molekularna filogenetska analiza gena 9 dokazanih RVA

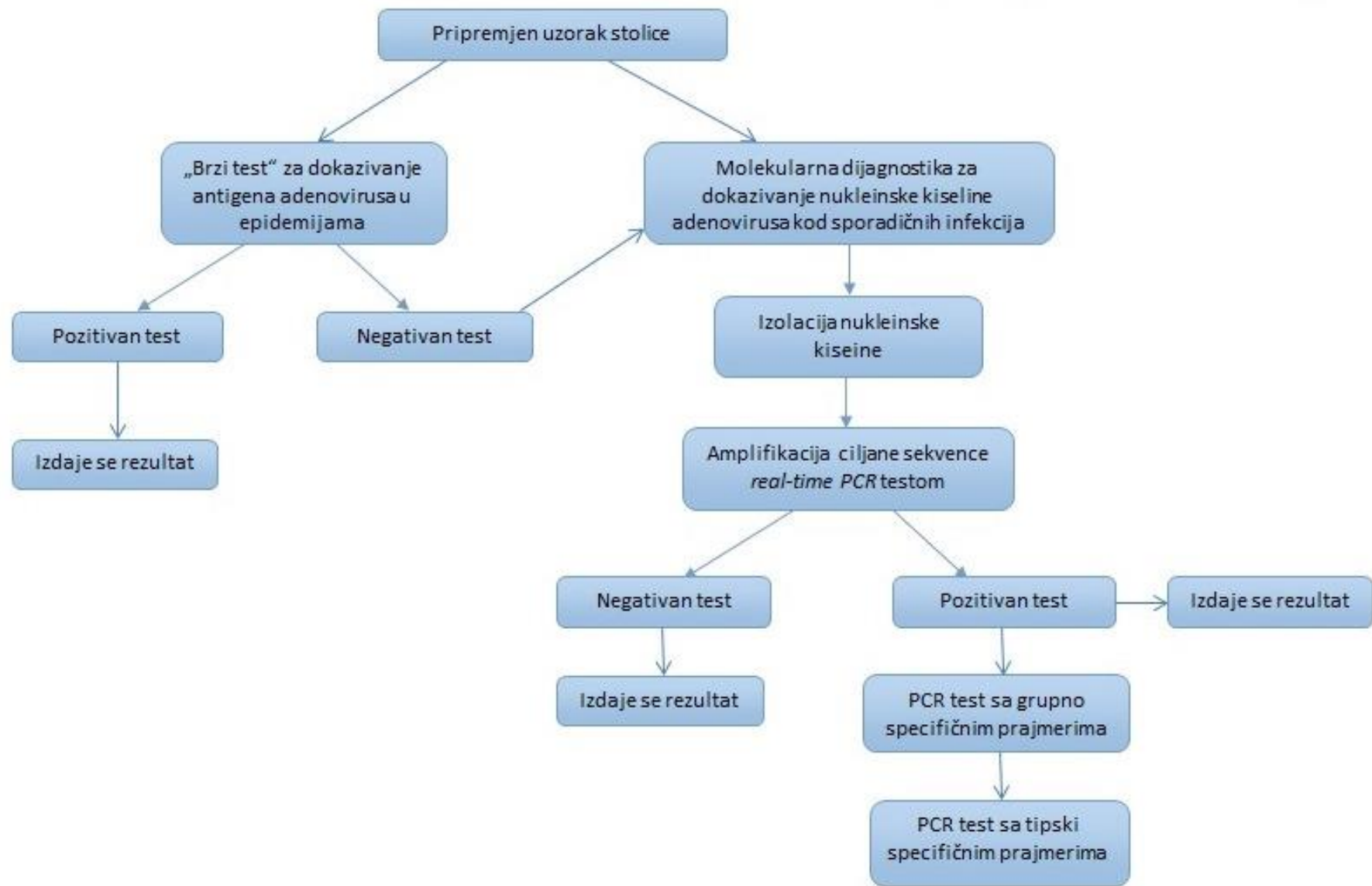
Filogenetsko stablo je konstruisano u programskom paketu MEGA 6.0, metodom *Maximum Likelihood* baziranom na modelu *Kimura 2-parameter* sa *Bootstrap* vrednošću od 1000 ponavljanja;

■ nukleotidne sekvence RVA iz Srbije, ■ referentni izolati; ● Human rotavirus grupe B, koji je korišćen kao *outgroup*.

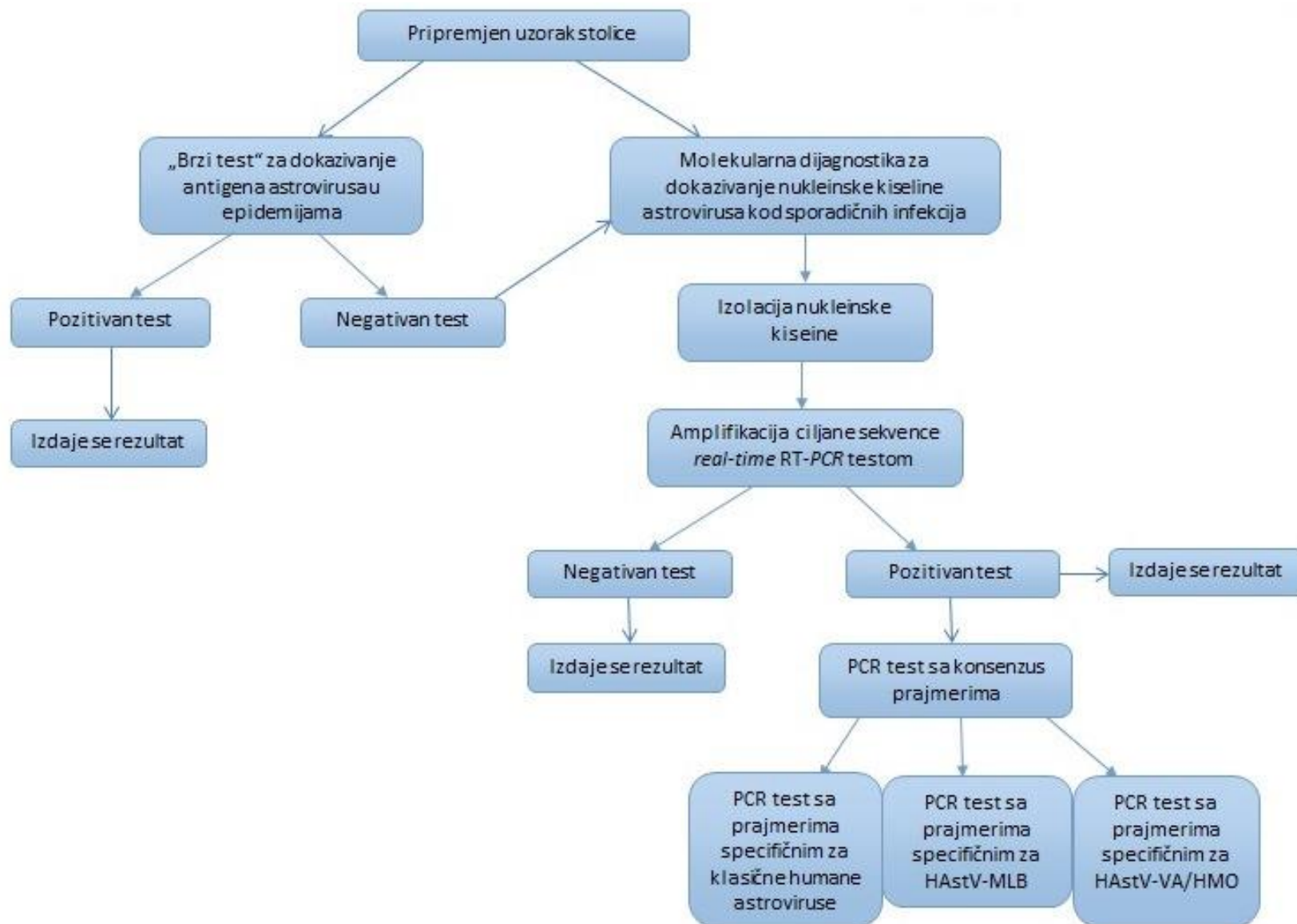
6.9. Algoritam primene *real-time PCR* testa u dijagnostici virusnog gastrointestinalnog sindroma

Jedan od važnih ciljeva ove doktorske disertacije bio je postavljanje algoritma primene *real-time PCR* testa u rutinskom dijagnostičkom radu na identifikaciji najčešćih uzročnika virusnog dijarealnog sindroma u Vojvodini. Algoritam treba da omogući tačnu i brzu dijagnostiku virusnog uzročnika bolesti. Brza i tačna dijagnostika je vrlo značajna za efikasno sprovođenje terapijskih i protivepidemijskih mera. Kada se bolest javi sporadično, sa tipičnim kliničkim karakteristikama dijarealnog sindroma, preporuka je da se u dijagnostici primeni molekularni *real-time PCR* test, da bi se što brže i tačnije postavila dijagnoza virusnih uzročnika. Važno je i da se spreči širenje bolesti i nastanak epidemije. U slučaju da postoji epidemija sa većim brojem obolelih, preporuka je da se uradi „brzi test“ za dokazivanje virusnog antigena. Ukoliko je „brzi test“ pozitivan, izdaje se rezultat, a ukoliko je rezultat negativan, zbog znatno manje osetljivosti „brzog testa“, potrebno je uzorak pregledati i molekularnom dijagnostikom - *real-time PCR* testom. Ako je i *real-time PCR* test negativan, izdaje se rezultat, a ukoliko je pozitivan izdaje se rezultat i primenjuju se sve protivepidemijske i terapijske mere.

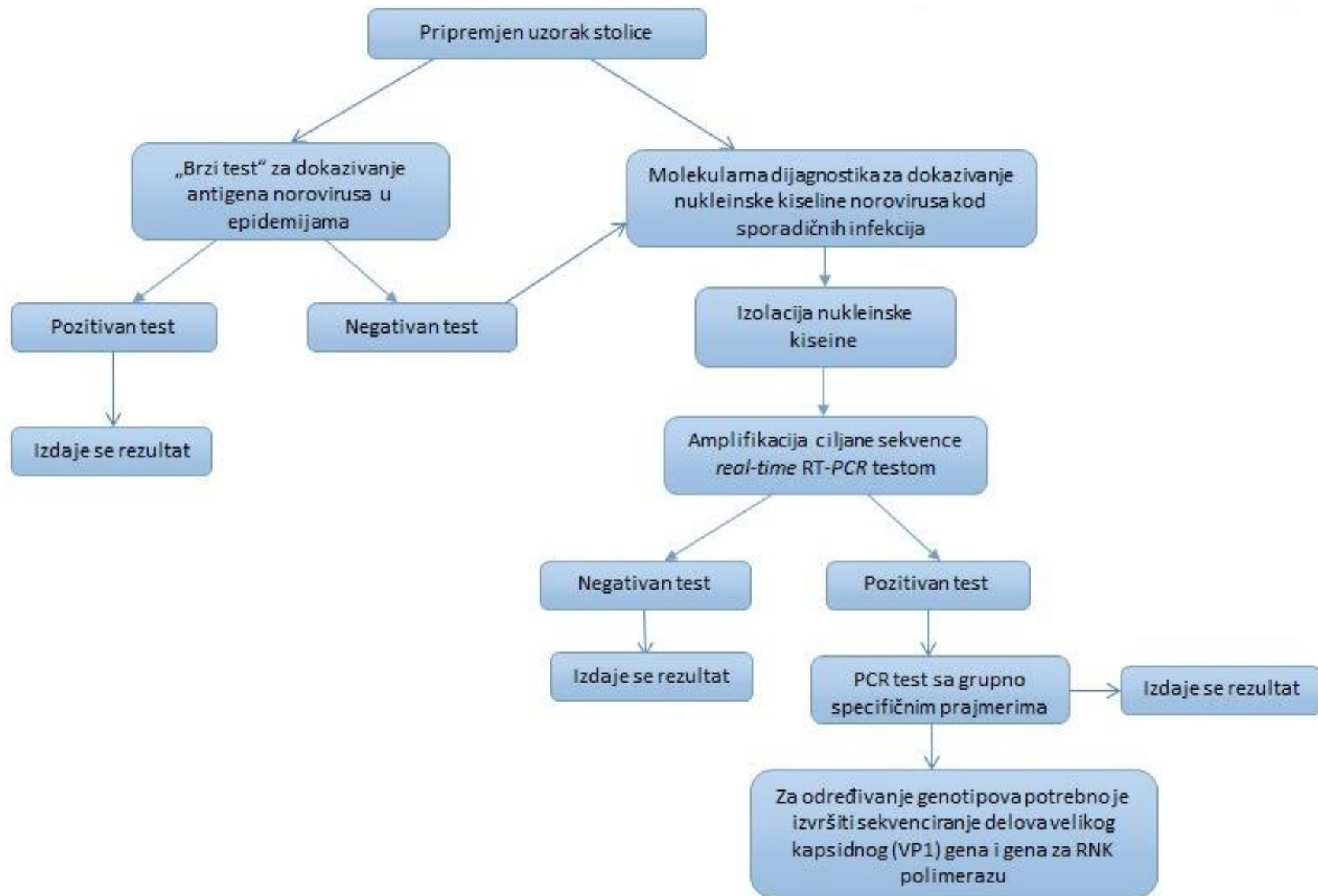
Posebno kod epidemijskog javljanja bolesti, ali i kod sporadične pojave infekcije, može se raditi i detaljnija molekularna analiza (utvrđivanje genogrupa i genotipova), kao i analiza delova genoma dokazanih virusa sekvenciranjem. Ova analiza može da utvrdi dodatne podatke o virusu, kao što je postojanje mutacija u genomu. Čak i male promene u genomu mogu da utiču na virulentnost virusa i njegove epidemiološke karakteristike. To može da ima klinički i epidemiološki značaj zbog bržeg širenja virusa u populaciji, nastanka većih epidemija i teže kliničke slike kod obolelih.



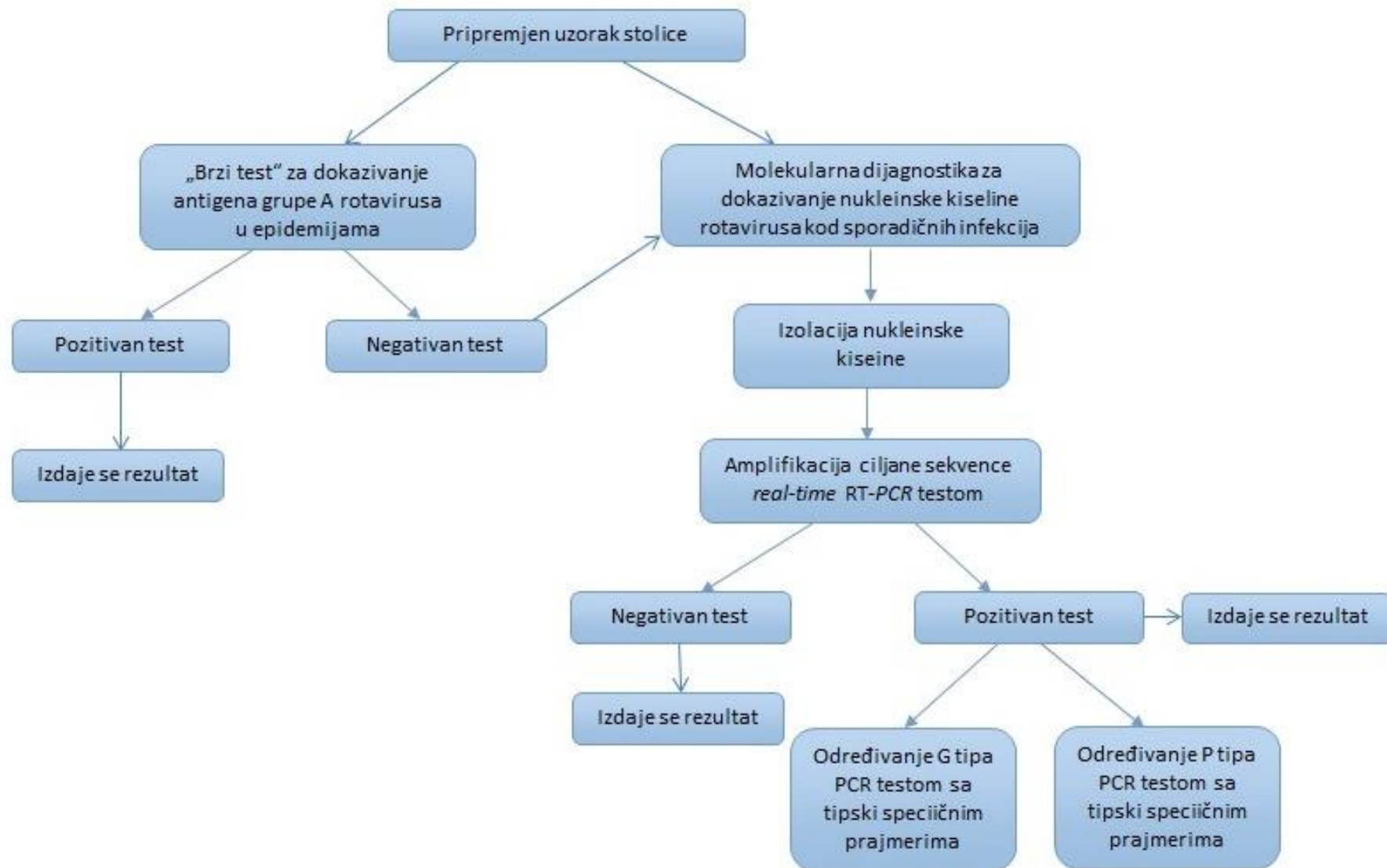
Slika 37. Algoritam primene PCR testa u dijagnostici adenovirusa



Slika 38. Algoritam primene *RT-PCR* testa u dijagnostici astrovirusa



Slika 39. Algoritam primene *RT-PCR* testa u dijagnostici norovirusa



Slika 40. Algoritam primene *RT-PCR* testa u dijagnostici rotavirusa

7.0. Diskusija

U petogodišnjem periodu (2012-2016.), koliko je trajalo ovo ispitivanje, *real-time PCR* testom pregledane su 1003 obolele osobe sa prisutnim kliničkim pokazateljima gastrointestinalnog sindroma, starosti od mesec dana do preko 90 godina. Obolele osobe pregledane su na rota, noro, astro i na enterične adenoviruse, navedene u literaturi kao najčešći uzročnici dijarealnog sindroma. Pregledom na 4 virusa utvrđeno je 709 obolelih (70,69%). Dobijeni rezultati omogućili su sagledavanje incidence virusnog gastrointestinalnog sindroma.

Preporuka je da *real-time PCR* test bude metoda izbora u budućoj dijagnostici uzročnika virusnog gastrointestinalnog sindroma, jer omogućava brzo dobijanje dijagnostičkih rezultata, što je neophodno, kako za odgovarajući tretman obolelih, koji je potrebno da bude brz i adekvatan, tako i za preduzimanje preventivnih mera da se infekcija ne proširi u epidemiju. Kako je virusni gastrointestinalni sindrom bolest koja po pravilu nastaje naglo i pošto brzo dovodi do gubitka vode i elektrolita, bitno je da se što pre pristupi tretmanu obolelih i sprečavanju komplikacija, kao i epidemiološkim merama da se zaustavi dalje širenje infekcije. Pošto je broj tečnih dijarealnih stolica velik (kod obolelih od svih ovih virusa najčešće je bilo 5-7 stolica dnevno), jedna od mogućnosti je da u uzorcima tečnih stolica nema uvek veći broj virusnih partikula. *Real-time PCR* test ima prednosti što, u odnosu na druge testove, može da dokaže virus čak i ako je prisutan u sasvim malom broju u uzorku dijarealne stolice (129,146).

U ovom radu je potvrđeno da se *real-time PCR* testom može postaviti tačna etiološka dijagnoza i kod obolelih sa blagom kliničkom slikom, kod kojih virus može da bude prisutan u vrlo malom broju u uzorku stolice, zbog kasno uzetog uzorka. Ovi oboleli se vrlo često ni ne javljaju lekaru. Baš zbog toga šire infekciju i dovode do nastanka ili širenja epidemije. Zato ih je potrebno otkriti i obavezno poslati na dijagnostički pregled, a potom primeniti potrebne mere. Oboleli sa blagom kliničkom slikom obično budu negativni „brzim testovima“. Neadekvatno čuvanje i transport uzoraka stolice do laboratorije može, isto tako, da dovede do smanjenja broja virusnih partikula u uzorku i da se zato dobiju lažno negativni rezultati „brzim testovima“. Ovaj problem se može prevazići upotrebom *real-time PCR* testa (129,146).

Rezultati istraživanja pokazuju da je u petogodišnjem periodu kod 1003 pregledana bolesnika različite starosti na rota, noro, astro i enterične adenoviruse, akutna infekcija nekim od ova četiri virusa dokazana *real-time PCR* testom kod 709 obolelih (70,69%). Među njima, 677 je bilo pozitivno na jedan virus (rota, noro, astro ili adenovirus), a 32 bolesnika imala su dokazana dva virusa u stolici (udruženu infekciju). Ovaj podatak nesumnjivo pokazuje značaj virusnog

gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini i neophodnost redovnog sprovođenja molekularne dijagnostike kod svih osoba sa znacima akutnog dijarealnog sindroma.

Na ukupnom uzorku najčešće je dokazana rotavirusna infekcija – kod 28,81% pregledanih, zatim, norovirusna infekcija – kod 23,03%, astrovirusna infekcija – kod 2,29% obolelih, infekcija enteričnim adenovirusima - kod 13,36% osoba sa dijarealnim sindromom, a dva virusa u stolici dokazana su kod 3,19% ispitanih bolesnika. Slični podaci o učestalosti navedenih virusa prikazani su u dvogodišnjem istraživanju sprovedenom u 8 gradova Rusije (147).

Rotavirusna infekcija je tokom ovog istraživanja bila statistički značajno najčešće utvrđena 2015. godine (kod 40,70% obolelih osoba). U ostalim godinama rotavirusna infekcija bila je dokazana u manje više ujednačenom procentu bolesnika: 2012. godine u nešto većem procentu - kod 29,0%, 2013. godine kod 21,23%, 2014. godine kod 24,37%, a 2016. godine kod 23,97% obolelih. To ukazuje na stalno javljanje rotavirusnih infekcija u našoj sredini. U literaturi se navodi, u mnogim publikovanim radovima, da je rotavirus najčešće uzročnik dijarealnog sindroma i to posebno kod male dece i dece predškolskog i školskog uzrasta. To je dokazano i tokom ovog istraživanja i to svake godine rada na dijagnostici virusne dijarealne bolesti. Rotavirusna infekcija je statistički značajno najčešće dokazana kod dece do 5 godina (u 38,90% na celokupnom uzorku), što se, isto tako, slaže sa navodima u mnogim publikacijama. U trogodišnjoj studiji, koja je sprovedena u Španiji, gde su analizirani uzorci stolice 352 hospitalizovana deteta mlađa od 5 godina, rotavirus je bio najčešći uzročnik bolesti – čak u 45,7% obolelih (148). Slični rezultati dobijeni su i u istraživanju sprovedenom u Italiji. Kod dece mlađe od 5 godina, rotavirusna infekcija je dokazana kod 34,9% pregledanih bolesnika RT-PCR testom (149). U dvogodišnjem istraživanju sprovedenom u 8 gradova Rusije pregledani su hospitalizovani bolesnici sa gastrointestinalnim sindromom različite starosti. Rotavirusna infekcija je najčešća bila kod dece do 5 godina u 43,6% i kod dece uzrasta 5 do 14 godina u 20,4%. Norovirusna infekcija je bila prisutna u 12,5% kod dece mlađe od 5 godina i u 14,3% kod dece stare 5 do 14 godina. Astrovirusi, kao uzročnici dijareje, utvrđeni su kod dece mlađe od 5 godina u 1,1%, a kod dece od 5 do 14 godina u 2,0%. Adenovirusna infekcija je dokazana kod dece do 5 godina u 3,5%, a kod dece od 5 do 14 godina u 5,3% (147). Kod odraslih bolesnika procenat dokazanih ovih virusnih uzročnika dijarealnog sindroma bio je manji, nego što je utvrđen tokom istraživanja u okviru ove doktorske disertacije. Niži procenat dokazanih uzročnika kod odraslih osoba u Rusiji može se objasniti tako, što su u ovu studiju bili uključeni samo hospitalizovani bolesnici, a poznato je da dosta često odrasle osobe ne budu hospitalizovane ili se ne jave lekaru, pa samim tim ne budu registrovani, a mogu da šire infekciju i doprinesu nastanku epidemija. Međutim, tokom istraživanja u okviru ove disertacije, značajan procenat pozitivnih osoba na rotavirus bio je i u svim starosnim grupama, kao i u svakoj godini istraživanja, pa čak i

kod osoba starih 50 i više godina (18,75%). Rotavirusne infekcije kod odraslih često mogu biti povezane sa nastankom epidemija u porodicama, gde se infekcija prenosi sa obolele dece na roditelje, zatim, bolest može da nastane i na putovanjima u regione gde su ove infekcije češće, kao i u kolektivima ili ustanovama, gde ove osobe borave i rade. Najteža klinička slika sa mogućim komplikacijama, osim kod male dece, može da nastane i kod hroničnih bolesnika i imunodeficitarnih osoba (76).

Norovirusna infekcija je potvrđena u manje više ujednačenom procentu obolelih osoba svake godine trajanja ovog istraživanja. Tokom 2012. godine noro pozitivnih osoba bilo je 20,0%, 2013. godine 21,23%, 2014. godine najmanje – 18,27%, 2015. godine 22,81%, a 2016. godine utvrđeno je najviše obolelih od norovirusa tokom ovog ispitivanja – 29,75% slučajeva. U radovima, koji govore o norovirusnim infekcijama u raznim sredinama, prikazan je značaj ovih virusa, kao uzročnika dijarealnog sindroma, pogotovo kod odraslih osoba (150,151). Rezultati ovog istraživanja slažu se sa podacima iz literature. Statistički značajno najviše obolelih od norovirusa bilo je utvrđeno kod odraslih bolesnika, kod svih starijih od 20 godina. Tako je procenat obolelih kod najstarijih osoba, starih 50 i više godina bio 36,61%, kod osoba starih 30 do 49 godina 31,63% i osoba starih 20 do 29 godina 41,94%. Slični podaci dobijeni su i u istraživanjima, publikovanim u različitim zemljama. Prema dvogodišnjoj studiji, sprovedenoj u Berlinu, gde su pregledane hospitalizovane osobe starije od 18 godina, norovirus je dokazan u 23% obolelih i bio je najčešće dokazan virusni uzročnik gastroenterokolitisa (152).

Tokom petogodišnjeg istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, norovirusne infekcije bile su dokazane svake godine trajanja istraživanja i to u svim starosnim grupama obolelih (kod dece do 5 godina u 14,05%, kod dece uzrasta 6 do 14 godina u 24,14%, a kod dece stare 15 do 19 godina u 25,0%). Ovi podaci se slažu sa rezultatima publikovanim nakon trogodišnjeg istraživanja u Švedskoj, gde su RT-PCR testom utvrđene norovirusne infekcije u svim starosnim grupama obolelih i u svakoj godini istraživanja (kod odraslih norovirusna infekcija je dokazana u 23%, 26% i 30% prema godinama istraživanja, dok je kod dece, uzrasta do 15 godina, bila prisutna u 18%, 11% i 15% prema godinama istraživanja) (153). Procenat zastupljenosti norovirusnih infekcija varira u različitim istraživanjima, jer na rezultate utiču starost ispitivane populacije, kao i osetljivost dijagnostičke metode, koja je korišćena u istraživanju. Tokom ovog petogodišnjeg istraživanja kod odraslih su infekcije češće bile u okviru epidemija. Statistički značajno najčešće je epidemijsko javljanje bolesti dokazano kod osoba starijih od 50 godina. Kod dece uzrasta do 14 godina bile su statistički značajno češće dokazane sporadične infekcije. Norovirus je dokazan kao statistički značajno najčešći uzročnik epidemija. Sve ove činjenice su verovatno doprinele većem broju norovirusnih infekcija kod odraslih osoba.

Tokom ovog istraživanja astrovirusna infekcija je bila utvrđena u znatno manjem procentu (2,29% na ukupnom uzorku). Bila je dokazana samo kod dece uzrasta do 5 godina (kod 12 dece – 2,44%) i kod dece stare 6 do 14 godina (kod 10 obolelih – 6,90%), dok je samo jedna obolela osoba bila stara 50 godina (u 2015. godini kada je bilo i nešto više astrovirusnih infekcija – 3,86%). Učestalost astrovirusnih infekcija i njihovo javljanje pretežno kod dece slaže se sa navodima iz literature. U šestogodišnjem istraživanju sprovedenom u Grčkoj, kod dece sa gastrointestinalnim tegobama, astrovirus je bio uzročnik bolesti u 2,35% (154). Studija sprovedena u Indiji utvrdila je astrovirusnu infekciju u 2,4% pregledanih (155), dok je kod hospitalizovane dece u Italiji utvrđeno 7% astro pozitivnih sa dijarealnim sindromom (156).

Adenovirusna infekcija, tokom ovog istraživanja, dokazana je u 13,36% slučajeva na ukupnom uzorku. Statistički značajno najčešće je bila utvrđena 2014. godine – kod 20,30% obolelih. U ostalim godinama ovog istraživanja, procenat pozitivnih bolesnika na enterične adenoviruse bio je ujednačen: 2012. godine 10,0%, 2013. godine 11,17%, 2015. godine 12,63% i 2016. godine 11,57%. Dobijeni podaci su uglavnom u skladu sa navodima iz literature, ali procenat pozitivnih ipak varira u različitim studijama. U četvorogodišnjoj studiji, sprovedenoj u Mađarskoj kod dece sa dijarealnim sindromom, adenovirusna infekcija je dokazana kod 8,1% pregledanih. Procenat adeno pozitivnih je varirao tokom trajanja ispitivanja i kretao se od 11,7% do 5,7% (157). Dijagnostička studija, sprovedena u Albaniji utvrdila je adenovirusnu infekciju kod 23,2% pregledane dece sa gastroenterokolitisima (158). Ovi podaci ukazuju na potrebu da se kod obolelih od dijarealnog sindroma vrši pregled i na enterične adenoviruse i to pogotovo kod dece, uzrasta do 14 godina, gde su adenovirusne infekcije, tokom ovog istraživanja, bile statistički značajno najčešće (kod dece do 5 godina dokazane su kod 16,70%, a kod dece stare 6 do 14 godina kod 17,24% na celom uzorku). Međutim, adenovirusne infekcije su bile utvrđene i kod odraslih bolesnika (najređe kod obolelih starih 50 i više godina – u 2,68% na celokupnom uzorku). Tokom ovog istraživanja, enterični adenovirusi bili su treći po učestalosti kao uzročnici virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini.

Dokazane infekcije sa dva virusa (u 3,19% na ukupnom uzorku) jedino nisu bile utvrđene 2013. i 2014. godine. Obično su po dva virusa bila dokazana u malom broju kod osoba svih starosnih grupa, upućenih na dijagnostički pregled zbog epidemioloških indikacija ili konstatovanih bolesti u kolektivu ili porodici. Slični procenti udruženih infekcija dobijeni su tokom istraživanja u Francuskoj (3,3%) i Iranu (3,5%) (159,160).

Svi ovi podaci ukazuju na potrebu da se kod obolelih sa znacima akutnog dijarealnog sindroma odmah pristupi dokazivanju virusnih uzročnika (pre svega rota, noro, astro i enteričnih adenovirusa), korišćenjem *real-time PCR* testa. Ovu dijagnostiku neophodno je raditi u svim

starijim grupama obolelih, ali naročito kod dece (do 5 godina i uzrasta 6 do 14 godina), kod koje su rota, noro, astro i enterični adenovirusi bili vrlo česti. Norovirusi, dokazani, u svim starosnim grupama obolelih, potrebno je da se obavezno dijagnostikuju *real-time RT-PCR* testom kod svih osoba sa dijarealnim sindromom. Naročito je bitno da se ova dijagnostika uradi kod odraslih bolesnika, gde se ove infekcije češće javljaju i kod obolelih starih 50 i više godina, gde komplikacije bolesti mogu da budu najteže, a ponekad i fatalne. Ovo pravilo takođe važi i kod male dece, uzrasta do 5 godina, gde posledice akutnog dijarealnog sindroma, najčešće izazvanog rotavirusima, mogu da budu veoma opasne (2,3,67,76).

Učestalost virusnog gastrointestinalnog sindroma, uzrokovanog rota, noro, astro i adenovirusima pokazuje da su ove virusne infekcije bile dokazivane tokom cele godine, ali da je najviše virusnog dijarealnog sindroma bilo u kasnu jesen, tokom zime i u rano proleće. Ovo važi za bolesti uzrokovane svim navedenim virusima, koji su bili predmet istraživanja. Najviše dokazanih virusnih gastroenteritisa bilo je u oktobru, novembru, decembru, januaru, februaru i martu, što je utvrđeno analiziranjem petogodišnjeg perioda ovog istraživanja. Navedeni podaci su u skladu sa citatima iz literature, gde se ističe da su ove infekcije u geografskim oblastima sa umerenom klimom najčešće u zimskom periodu, dok se u tropskim predelima javljaju podjednako često tokom cele godine (2,26,74,94,115). Treba istaći i podatak da, za razliku od virusnih dijarealnih sindroma, bakterijski gastroenteritisi se češće javljaju leti, odnosno, u toplom periodu godine (115).

Detaljno su analizirani i upoređivani klinički pokazatelji, prisutni u anketama popunjenim za svakog od ispitanika, kao i podaci u njihovim istorijama bolesti. Zaključeno je, nakon detaljne analize, da klinički pokazatelji ipak ne mogu da posluže za tačnu i preciznu diferencijalnu dijagnostiku o kom se virusnom uzročniku radi. Zato je neophodno da se što pre postavi etiološka dijagnoza bolesti, što omogućava pregled *real-time PCR* testom. To je vrlo bitno da bi se što ranije primenio adekvatan terapijski tretman obolelih i da bi se sprečile komplikacije, pa i mogući fatalni ishod bolesti kod nekih bolesnika. Ovo se prvenstveno odnosi na malu decu i odojčad, kao i na stare osobe, hronične i imunodeficitarne bolesnike. Još je značajnije da se, nakon brzo postavljene tačne dijagnoze, primene sve neophodne epidemiološke mere kako bi se sprečilo dalje širenje infekcije i nastanak epidemije (161).

Nagli početak bolesti utvrđen je u vrlo visokom procentu kod obolelih osoba sa dokazanim bilo kojim od virusa, koji su bili predmet ovog istraživanja (kod 86,74% bolesnika na uzorku pozitivnih na neki od virusa). U svim dijarealnim sindromima, bez obzira koji od virusa je bio uzročnik, nagli početak bolesti utvrđen je najčešće kod male dece (uzrasta do 5 godina), kod dece stare 6 do 14 godina i tinejdžera starih 15 do 19 godina, ali i kod mlađih odraslih osoba, starih 20 do 29 godina. Kod bolesnika starijih od 30 godina i starijih od 50 godina, bolest je takođe počinjala

naglo, ali kod nešto manjeg procenta obolelih. Moguće je da su starije osobe imale i dodatne simptome neke svoje primarne bolesti, ako su je imale, pa nisu odmah konstatovale znake dijarealnog sindroma. Prema tome, nagli početak bolesti ipak ne može da bude od diferencijalno dijagnostičkog značaja da bi se na osnovu tog podatka procenilo da li je virus i koji je virus uzročnik bolesti. Nagli početak bolesti kod osoba sa dijarealnim sindromom prvenstveno se ističe zbog neophodnosti da se odmah primeni adekvatan tretman obolelih. Ovaj klinički pokazatelj, prema navodima u literaturi, nema diferencijalno dijagnostički značaj (2,3,115).

Temperatura i broj stolica dnevno više su bili pokazatelji težine kliničke slike kod obolelog, nego što su imali diferencijalno dijagnostički značaj da se tačno pretpostavi o kom virusnom uzročniku se radi. Međutim, statističkom obradom celokupnog uzorka, utvrđeno je da je statistički značajno više bolesnika sa rotavirusnom infekcijom imalo povišenu temperaturu u odnosu na obolele od drugih virusa, koji su bili predmet istraživanja. Ovakvi podaci dobijeni su i tokom istraživanja virusnog dijarealnog sindroma u Nemačkoj, Litvaniji, Tajvanu i Rumuniji (162-165). Tokom ovog istraživanja utvrđeno je da ne postoje statistički značajne razlike u broju dijarealnih stolica kod obolelih od različitih virusnih uzročnika, kao ni u izgledu i sastavu ovih uzoraka. Nije postojala statistički značajna razlika ni u broju dijarealnih stolica kod dece uzrasta do 14 godina obolelih od rotavirusne infekcije (najčešće u ovom uzrastu) u odnosu na obolelu decu od drugih virusa. Krv u stolici bila je dokazana vrlo retko (u 1,69% na uzorku pozitivnih osoba na neki od virusa) i to češće kod starijih odraslih osoba, a najčešće kod obolelih starih 50 i više godina. Sluz je u dijarealnoj stolici dokazana nešto češće (u 16,93% na uzorku pozitivnih bolesnika na neki od virusa) i to češće kod starijih osoba, a najčešće kod obolelih starih 50 i više godina. U literaturi se navodi da je u dijarealnoj stolici bila češće dokazana krv i sluz, kada uzročnici nisu bili virusi (162).

Hospitalizacija obolelih je kod svih infekcija, izazvanih dokazanim virusnim uzročnicima, bila najčešća kod male dece, uzrasta do 5 godina (kod 92,66%), zatim 6 do 14 godina (kod 83,96%) i tinejdžera starih 15 do 19 godina (kod 78,13%). Dobijeni podaci se slažu sa navodima u literaturi (2,36). Tokom ovog istraživanja, utvrđene epidemije i obolevanja u kolektivu ili porodici, kod svih ispitivanih virusa bili su najčešće potvrđeni kod odraslih osoba. To su bili samo pokazatelji epidemioloških činjenica i saznanja, ali nisu imali presudan diferencijalno dijagnostički značaj. Radilo se pre svega o težini bolesti, kliničkoj slici kod obolelih osoba i o epidemiološkim pokazateljima. U literaturi svi ovi podaci se navode kao bitne činjenice i kao pokazatelji težine bolesti, ali bez većeg diferencijalno dijagnostičkog značaja. Najveći značaj ovi podaci imaju da bi se sprečio nastanak epidemija.

Muka i povraćanje, prisutni kod osoba sa dijarealnim sindromom, izazvanim virusnim uzročnicima koji su bili predmet ovog istraživanja, ipak su bili statistički značajno češće dokazani

kod norovirusne infekcije. Iste podatke navode i istraživači koji su ispitivali kliničku sliku virusnog dijarealnog sindroma u Nemačkoj, Litvaniji i Tajvanu (162-164). Kod obolelih od norovirusa, uz muku i povraćanje, nešto češći su bili i bolovi u stomaku (grčevi). Minimalno češće se javljala i glavobolja, bolovi u mišićima, malaksalost, jeza i drhtavica. Međutim, svi ovi simptomi, mada nešto ređe, utvrđeni su i kod rota, astro i adenovirusnih infekcija. Mada su muka i povraćanje, kao i bolovi u stomaku, bili simptomi statistički značajno češći kod infekcije norovirusom, ni prisustvo ovih kliničkih manifestacija bolesti nije dovoljno za tačnu diferencijalnu dijagnozu i sigurnu procenu o kom se virusnom uzročniku dijarealnog sindroma radi kod obolelih. Zato, mada su kliničke manifestacije akutnog dijarealnog sindroma navedene u literaturi kao bitni i značajni parametri, one više imaju klinički značaj i govore o težini bolesti, nego što se mogu koristiti u tačnoj diferencijalnoj dijagnozi o kom se virusnom uzročniku radi kod obolelih. Sve navedeno potvrđuje nepochodnost da se što pre postavi tačna etiološka dijagnoza oboljenja. *Real-time PCR* test to omogućava brzo i efikasno, čak i u dijarealnim uzorcima u kojima može da bude znatno manji broj virusnih čestica zbog velikog broja tečnih stolica (129,146).

Trajanje bolesti bilo je bez većih razlika u odnosu na vrstu virusa, uzročnika dijarealnog sindroma, ako se podaci o trajanju bolesti analiziraju prema starosti obolelih. Uglavnom je to zavisilo od težine kliničke slike, tretmana obolelih (odmah ili malo kasnije) i od ostalih zdravstvenih karakteristika dotičnog bolesnika.

Ipak, statističkom obradom celokupnog uzorka utvrđeno je, osim činjenice da je statistički značajno više pacijenata koji su imali infekciju rotavirusom imalo povišenu temperaturu u odnosu na obolele od ostalih virusnih uzročnika, da je isto tako, statistički značajno kod obolelih od rotavirusne infekcije bolest trajala duže (4 i više dana) u odnosu na bolesnike sa gastrointestinalnim sindromom izazvanim drugim virusima. Ovi podaci se slažu sa rezultatima dobijenim u studijama u Nemačkoj, Francuskoj, Litvaniji i Tajvanu (36,162-164). Verovatno je jedan od razloga i činjenica da su rotavirusne infekcije značajno najčešće dokazane kod male dece (uzrasta do 5 godina). Naime, mala deca su imala višu temperaturu, bila su češće hospitalizovana i bolest im je trajala duže.

Statistička obrada celokupnog uzorka pokazala je da je statistički značajno više pacijenata zaraženih rotavirusom bilo kod dece mlađe od 5 godina u odnosu na ostale starosne grupe pregledanih osoba sa virusnim gastrointestinalnim sindromom, dok je statistički značajno više pacijenata zaraženih norovirusom bilo kod bolesnika starijih od 20 godina. Statistički značajno više pacijenata zaraženih adenovirusom bilo je kod dece uzrasta do 5 godina i 6 do 14 godina. Oboleli od astrovirusa bila su deca do 5 godina i 6 do 14 godina.

Analiziranjem svakog obolelog od virusnog dijarealnog sindroma, korišćenjem Vesikari skale, dobijeni su značajni podaci na celokupnom uzorku. Vesikari skala, na osnovu prisutnih tegoba kod obolelog i ostalih značajnih podataka o bolesti, omogućava grupisanje pacijenata u tri kategorije: bolesnike sa blagom, srednje teškom i teškom bolešću (145). Pošto su samo pojedinačni slučajevi obolelih na celokupnom uzorku imali definisanu blagu kliničku sliku bolesti, spojene su grupe obolelih sa blagom i srednje teškom kliničkom slikom i upoređivani su u odnosu na bolesnike sa teškom kliničkom slikom. Nakon izvršene analize, korišćenjem Vesikari skale, dobijeni su podaci da je statistički značajno više pacijenata sa teškom kliničkom slikom bilo kod dece uzrasta do 5 godina u odnosu na obolele iz ostalih starosnih grupa na celokupnom uzorku. Isto tako, statistički značajno više pacijenata sa rotavirusnom infekcijom imalo je težu kliničku sliku u odnosu na bolesnike obolele od drugih virusa. Moguće je da je to bilo i zbog činjenice da je značajno više pacijenata zaraženih rotavirusom bilo kod dece uzrasta do 5 godina. Podatak da su obolele osobe sa rotavirusnom infekcijom imale težu kliničku sliku bolesti dobili su i istraživači u Francuskoj, Rumuniji i Nemačkoj, analizirajući istovremeno uzorke i kliničku sliku obolelih od različitih virusnih uzročnika (36,162,165).

Primenom Vesikari skale nisu utvrđene statistički značajne razlike u težini kliničke slike kod obolelih od norovirusa i kod obolelih od astrovirusa. Međutim, statistički značajno više pacijenata sa adenovirusnom infekcijom imalo je blagu i srednje tešku kliničku sliku bolesti. Statistički značajno više pacijenata sa udruženom infekcijom (sa prisutna dva virusa u uzorcima stolice) imalo je težu kliničku sliku. Bolesnici sa udruženom infekcijom imali su težu kliničku sliku i u istraživanjima u Španiji i Italiji (166,167).

Analizom celokupnog uzorka, utvrđeno je da postoji i statistički značajna korelacija između starosti obolelih i težine kliničke slike. Na ovom pregledanom uzorku navedena korelacija je bila neznatna, što znači da je sa povećanjem godina obolelih, klinička slika bolesti bila nešto blaža.

Grupisanje težine kliničke slike po Vesikari skali pokazalo se kao značajno. To je dalo mnogo preciznije podatke o kliničkim pokazateljima i o težini kliničke slike kod obolelih, kako prema virusnim uzročnicima gastrointestinalnog sindroma, koji su bili utvrđeni, tako i prema starosti obolelih.

Svi ovi podaci nesumnjivo doprinose sagledavanju značaja virusnog gastrointestinalnog sindroma u vojvođanskoj populaciji i postavljanju algoritma primene najsavremenijih molekularnih metoda (*real-time PCR* testa) u redovnoj dijagnostici dijarealnog sindroma, kako kod sporadičnih slučajeva bolesti, da bi se sprečio nastanak epidemija, tako i kod epidemijskog javljanja gastroenterokolitisa. Ovo su bili i ciljevi prikazanog petogodišnjeg istraživanja, koji su ispunjeni.

Primenom *real-time PCR* testa, kao jedne od najsavremenijih molekularnih metoda za dijagnostiku virusnih gastrointestinalnih sindroma, utvrđena je incidencija virusnih gastroenterokolitisa u Vojvodini. Ona, na uzorku od 1003 pregledane osobe u petogodišnjem periodu i nakon sprovedene dijagnostike na četiri virusna uzročnika, iznosi 70,69%. Ovo je značajno veći procenat od procenta 30-40% koliko je navedeno u hipotezi prilikom prijave ovog istraživanja. Procenat 30-40% bio je napisan na osnovu podataka koji su prikazani u publikacijama iz okolnih regiona, gde su, istina tek 2011. godine, započele svestranije dijagnostičke mere, uz zakonskim propisima obavezno prijavljivanje virusnih enterokolitisa, bar tokom epidemijskog javljanja (6,154,168). Ranije su često virusni dijarealni sindromi utvrđivani tako, što je prvobitno bio isključen mogući bakterijski uzročnik dijareje. Zatim se navodilo da je u pitanju virusna etiologija, jer su klinički simptomi označeni kao bitni pokazatelji ovog zaključka, a da se pri tome često nije konačno ni postavila tačna etiološka dijagnoza laboratorijskim testovima.

U petogodišnjem periodu, tokom ovog istraživanja, dokazani su virusni uzročnici kod 22 epidemije u kolektivima i kod još 9 porodičnih epidemija. Obolevanje u sklopu epidemijske pojave bolesti (prema podacima navedenim u anketama, koje su bile ispunjene za svakog obolelog i istorijama bolesti), utvrđeno je kod 206 bolesnika (29,06%). Sporadična pojava gastroenterokolitisa virusne etiologije utvrđena je kod 503 obolele osobe (70,94%). Analizirani rezultati pokazali su da je norovirus statistički značajno najčešće bio uzročnik epidemija na pregledanom celom uzorku. Statistički značajno češće su sporadične infekcije bile utvrđene kod dece mlađe od 5 godina, u odnosu na epidemijско javljanje bolesti. Kod dece mlađe od 5 godina, bolest se javljala sporadično kod 86,30%. Isto tako, kod dece uzrasta 6 do 14 godina, statistički značajno češće su bile sporadične infekcije (kod 73,45%) u odnosu na epidemijско javljanje bolesti. Epidemijски nastale infekcije bile su statistički značajno najčešće kod najstarijih bolesnika, starih 50 i više godina (kod 71,43% obolelih). U ostalim starosnim grupama osoba sa dijarealnim sindromom, nisu postojale statistički značajne razlike u učestalosti sporadičnog i epidemijskog javljanja bolesti. Ovi podaci su dobijeni kada se analizira svaka starosna grupa pojedinačno. Dobijeni rezultati o sporadičnom i epidemijskom javljanju virusnog dijarealnog sindroma, prema starosti obolelih, prilično variraju u različitim istraživanjima, pre svega zavisno od karakteristika ispitivane populacije, geografskog regiona i socioekonomskih uslova.

Sve navedeno daje potpunu i celovitu sliku o značaju virusnog gastrointestinalnog sindroma u Vojvodini. Utvrđeno je da je najčešći uzročnik infekcija bio rotavirus, pogotovo kod dece. Najčešći uzročnik bolesti kod odraslih osoba bio je norovirus, koji je i najčešće izazivao epidemije. Treći po učestalosti uzročnik dijareje bio je adenovirus (najčešće kod dece), dok se astrovirusna infekcija javljala samo sporadično. Podaci dobijeni ovim istraživanjem pomogli su postavljanju

algoritma primene *real-time PCR* testa u rutinskom dijagnostičkom radu na identifikaciji najčešćih uzročnika virusnog dijarealnog sindroma u Vojvodini (rota, noro, astro i adenovirus), što je bio jedan od važnih ciljeva ove doktorske disertacije. Algoritam treba da omogući tačnu i brzu dijagnostiku virusnog uzročnika bolesti, što je vrlo značajno za efikasno sprovođenje terapijskih i protivepidemijskih mera.

Molekularna tipizacija i filogenetska analiza detektovanih adenovirusa

Adenovirusi spadaju u značajne uzročnike virusnog gastroenteritisa širom sveta. Po nekim istraživanjima, posle rotavirusa, adenovirusi predstavljaju drugog najznačajnijeg uzročnika gastroenteritisa kod male dece. U ovom istraživanju adenovirusi su bili treći po učestalosti kao uzročnici virusnog gastroenteritisa u Vojvodini. Sa gastroenterokolitisom su najčešće povezani tipovi 40 i 41 (iz grupe F), koji se i nazivaju enterični adenovirusi. Oni se smatraju odgovornim za 1 do 20% slučajeva dijarealne bolesti širom sveta, kako kod ambulantno lečene dece, tako i kod hospitalizovane dece (169-171). Međutim, poslednjih godina sve više se navodi značaj i neenteričnih adenovirusa u nastanku dijarealnog sindroma, što potvrđuju istraživanja vršena u različitim delovima sveta (172-174). Pominju se tipovi 12, 18, 31 (iz grupe A) i tipovi 1, 2, 5 i 6 (iz grupe C), kao mogući, uzročnici gastrointestinalnih tegoba, ali ređe (3,122,123).

Za potrebe istraživanja u toku ove doktorske disertacije izabrano je 5 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane adenoviruse *real-time PCR* testom. Ovim uzorcima je sekvenciran deo genoma hekson gena. Reprezentativni uzorci su dobijeni od dece od 1 meseca do 3 godine starosti, jer se kod dece adenovirusna infekcija i najčešće javljala (kako u ovom istraživanju, tako i po podacima iz literature). Ova deca su imala karakterističnu kliničku sliku virusnog gastroenterokolitisa. Uglavnom su lečena bolnički, iako je jedno dete lečeno ambulantno (uzorak 1). Kod svih reprezentativnih uzoraka radilo se o sporadičnom javljanju infekcije, osim kod uzorka 4, koji je uzet od deteta tokom epidemije izazvane adenovirusom. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom je utvrđeno da sekvence tri uzorka pripadaju grupi F HAdV, pri čemu dva uzorka (uzorak 3 i 4) pripadaju tipu 41, a jedan (uzorak 1) pripada tipu 40. Preostala dva uzorka (uzorak 2 i 5) pripadaju grupi C HAdV i tipu 2.

Dve sekvence HAdV iz uzoraka stolice obolele dece u ovom istraživanju (uzorak 3 i 4) pripadaju HAdV tipu 41, što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Tak. Sekvence uzoraka 3 i 4 pokazale su 100% sličnosti sa sekvencom HAdV 41 izolovanom iz reke Dunav u Novom Sadu (175). Prisustvo virusa, koji se izlučuju stolicom ljudi i životinja, u površinskim i otpadnim vodama predstavlja rizik za javno zdravlje stanovništva. Navodi se da je

dokazano da postoji povezanost između virusa prisutnih u životnoj sredini i virusa izolovanih iz kliničkih uzoraka u datoj godini i u određenim oblastima, odnosno, geografskim područjima. To znači da su tipovi virusa, koji su se javljali u kanalizacionoj vodi, odgovarali tipovima virusa koji su izolovani u kliničkim uzorcima obolelih osoba tokom ispitivane godine (176,177). Poklapanje sekvence HAdV iz uzoraka vode reke Dunav i uzoraka obolele dece u ovom istraživanju potvrđuje navedenu tvrdnju. Isto tako, sekvence uzoraka 3 i 4 tokom ovog istraživanja pokazale su 100% sličnosti sa sekvencom HAdV 41 izolovanom iz stolice dece u Brazilu, sekvencom HAdV 41 izolovanom u Finskoj, kao i 99% sličnost sa sekvencom HAdV izolovanom iz stolice dece u Indiji (178,179).

Adenovirusi izazivaju obično sporadične infekcije, ali mogu biti uzročnici i epidemija gastroenteritisa među decom i odraslim osobama, posebno u ustanovama kao što su zabavišta, škole i bolnice. Naročito značajni kao uzročnici epidemija gastroenteritisa su enterični adenovirusi (tipovi 40 i 41). Tokom ovog istraživanja adenovirusi su bili i uzročnici epidemije gastroenteritisa, a uzorak 4 je uzet od obolelog deteta tokom epidemije. Epidemija se širila kontaktnim putem, što je i najčešći način prenošenja ovih virusa.

Sekvenca HAdV uzorka 1 iz stolice obolelog deteta utvrđeno je da pripada HAdV tipu 40, što je potvrđeno i na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom HAdV F. Sekvenca uzorka 1 HAdV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom HAdV 40 izolovanom iz Paličko jezera u Vojvodini, sekvencom HAdV 40 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Indiji i sekvencom HAdV 40 izolovanom iz stolice dece u Brazilu (175,178).

Humani adenovirusi tipovi 40 i 41 obično su podjednako često zastupljeni u svetu u uzorcima obolelih. Međutim, u novijim istraživanjima, primećeno je smanjenje zastupljenosti HAdV tipa 40 u odnosu na tip 41. Smatra se da je HAd tip 41 postao dominantan genotip kao uzročnik bolesti kod pacijenata sa gastroenteritisom zbog pojave antigenskog drifta, što mu omogućava da izbegne delovanje ranije stečenog imuniteta kod obolelih i da dovede do povećanog broja infekcija kod osetljivih pojedinaca u populaciji (169,171). U ovom istraživanju, zbog malog broja izabranih uzoraka za sekvenciranje, ne može se potvrditi prisustvo ove pojave, ali je činjenica da su utvrđena dva HAdV tipa 41 i jedan HAdV tip 40 .

Značaj neenteričnih adenovirusa (drugih grupa adenovirusa osim F) u nastanku dijarealnog sindroma potvrđuju istraživanja vršena u različitim delovima sveta. U sedmogodišnjem istraživanju o učestalosti adenovirusa, izvršenom u Brazilu kod hospitalizovane dece sa gastroenteritisom, utvrđeno je da su HAdV iz grupe F bili najčešće uzročnici bolesti i to u 65% obolelih. Međutim, visok procenat adenovirusa kao uzročnika bolesti bio je i među drugim grupama HAdV: grupa A (12%), grupe C i D po 5%, a javljale su se i udružene infekcije sa dva različita tipa HAdV (173).

Isto tako, u trogodišnjem istraživanju sprovedenom u Kanadi utvrđena je visoka zastupljenost neenteričnih adenovirusa u uzorcima stolice obolelih: HAdV 31 (18%), HAdV 2 (11%), HAdV 1 (5%), HAdV 7 (4%), HAdV 5 (2%) i HAdV 3 (1%) (180). Slični rezultati dobijeni su i u dvogodišnjem istraživanju učestalosti adenovirusnih gastroenteritisa kod dece u Albaniji. Naime, kao uzročnici bolesti bili su najzastupljeniji HAdV iz grupe F (42%), ali u velikom procentu bili su zastupljeni i tipovi HAdV iz drugih grupa: grupa C (39%), grupa B (15%) i grupa A (3%) (172).

Tokom istraživanja u okviru ove doktorske teze neenterični adenovirusi utvrđeni su kao uzročnici gastroenteritisa. Sekvence dva izolata HAdV iz uzoraka stolice obolelih, označenih brojevima 2 i 5 pripadali su HAdV tipu 2, što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom HAdV C. Sekvence uzoraka 2 i 5 HAdV pokazale su 100% sličnost sa sekvencom HAdV 2, izolovanom u SAD-u, kao i 99% sličnost sa sekvencom HAdV 2 izolovanom u Španiji, Nemačkoj i Kini (181,182).

Detektovane sekvence, dobijene u ovom istraživanju, veoma su slične ili čak iste sa virusnim sojevima izolovanim u različitim, pa čak i udaljenim zemljama. Verovatno je to zbog široke rasprostranjenosti određenih sojeva adenovirusa. Adenovirusi, kao i drugi virusi, uzročnici gastroenteritisa, veoma su otporni u spoljnoj sredini. Oni dobro podnose visoke i niske temperature, veće promene pH vrednosti, sušenje, dejstvo dezinfekcionih sredstava i drugih hemijskih supstanci, što im omogućava duži opstanak u spoljnoj sredini. Prenose se direktnim kontaktom, a moguće je prenošenje i putem kontaminirane vode i hrane (26-29). Sve više putovanja po svetu, kao i povećana trgovinska razmena među zemljama, mogu da dovedu do veće mogućnosti nastanka epidemija konzumiranjem hrane, kontaminirane virusima, uzročnicima gastroenteritisa. Ovakve epidemije mogu da se prošire i na međunarodni nivo. To omogućava brzo širenje virusnih sojeva u različitim zemljama. Takođe, adenovirus je relativno stabilan virus sa dvolančanom DNK, kod koga znatno sporije dolazi do promena u genomu. Još jedan od razloga veoma velike sličnosti utvrđenih izolata tokom ovog istraživanja sa izolatima iz udaljenih zemalja je i činjenica da su analizirane sekvence veoma stabilnih delova genoma. Isto tako, postoji mali broj prijavljenih izolata adenovirusa iz okolnih zemalja. To važi, kako za izolate uzete iz kliničkih uzoraka, tako i za izolate iz uzoraka životne sredine.

Molekularna tipizacija i filogenetska analiza detektovanih astrovirusa

Humani astrovirusi, naročito klasični HAstV, smatraju se uzročnicima gastroenteritisa, koji pretežno izazivaju bolest kod dece širom sveta, iako su infekcije kod starijih i imunokompromitovanih osoba takođe prijavljene. Pored toga, astrovirusni gastroenteritis može se javiti i kod imunokompetentnih odraslih osoba (100,183,184). Klasični HAstV kao uzročnici javljaju se širom sveta i povezuju se sa 2 do 9% slučajeva akutne, nebakterijske dijareje kod dece, iako je procenat astrovirusnih infekcija u nekim istraživanjima bio veći – 26% kod dece sa dijarejom u Meksiku (100, 185).

Za potrebe istraživanja u toku ove doktorske disertacije izabrano je 5 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane astroviruse *real-time RT-PCR* testom. Ovim uzorcima je sekvenciran stabilan 5' region ORF2. Reprezentativni uzorci su dobijeni od dece uzrasta 2 do 8 godina. Ova deca su imala karakterističnu kliničku sliku virusnog gastroenterokolitisa. Kod svih reprezentativnih uzoraka radilo se o sporadičnom javljanju infekcije, osim kod uzorka 1, koji je uzet od deteta tokom epidemije izazvane norovirusom, pa je pored norovirusa, izolovan u stolici i astrovirus. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom je utvrđeno da sekvence svih uzoraka pripadaju grupi klasičnih HAstV, pri čemu dva uzorka (uzorak 1 i 5) pripadaju tipu 1, druga dva uzorka (uzorak 3 i 4) pripada tipu 5, a preostali uzorak (uzorak 2) pripada tipu 4.

Dve sekvence HAstV iz uzoraka stolice 1 i 5 pripadaju grupi klasičnih HAstV tipu 1, što je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom HAstV 1. Sekvenca uzorka 1 pokazala je 100% sličnosti sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Italiji, 99% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Urugvaju, kao i 97% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Kini i Tajlandu (186-189). Sekvenca uzorka 5 HAstV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Urugvaju i Rusiji, 98% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u Kini, kao i 97% sličnost sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Mađarskoj i sekvencom HAstV 1 izolovanom u Brazilu (187,188,190,191).

Sekvenca HAstV uzorka 2 iz stolice obolelog deteta tokom ovog istraživanja utvrđeno je da pripada grupi klasičnih HAstV i tipu 4, na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Dresden. Sekvenca uzorka 2 HAstV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom HAstV 4 izolovanom u Španiji, Rusiji, Kolumbiji i Australiji (192-194).

Na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Goiania, potvrđeno je da sekvence uzoraka 3 i 4 iz ovog istraživanja pripadaju klasičnom HAstV i tipu 5. Sekvenca uzorka 3 HAstV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom HAstV 5 izolovanom kod dece u Brazilu, sekvencom HAstV 5 izolovanom u SAD-u, Bangladešu i Libiji, kao i 98% sličnost sa sekvencom HAstV 5 izolovanom kod starijih osoba u Mađarskoj (195-198). Sekvenca uzorka 4 HAstV pokazala je 100% sličnost sa

sekvencom HAstV 5 izolovanom kod dece u Brazilu, sekvencom HAstV 5 izolovanom kod hospitalizovane dece u Libiji, kao i 99% sličnost sa sekvencom HAstV 5 izolovanom kod starijih osoba u Mađarskoj i sekvencom HAstV 5 izolovanom u SAD-u i Bangladešu (195-198).

Kada se govori o prevalenci klasičnih HAstV, može se primetiti da u većini istraživanja, sprovedenih u različitim delovima sveta, HAstV tip 1 je bio najčešće izolovani tip (192,199-201). I u istraživanju u okviru ove doktorske teze dobijeni su slični rezultati, jer je HAstV tip 1 bio utvrđen u dva uzorka obolele dece, ali isto toliko je bio prisutan i HAstV tip 5, koji je takođe dokazan u uzorcima dva obolela deteta. U jednom uzorku utvrđen je HAstV tip 4. Zbog malog broja izabраниh uzoraka za sekvenciranje, teško je izvući tačan zaključak o učestalosti pojedinih tipova HAstV, ali je činjenica da je HAstV tip 1 često prisutan i u našoj sredini.

Učestalost ostalih tipova unutar grupe klasičnih HAstV razlikuje se u različitim istraživanjima, kao i u različitim delovima sveta. Smatra se da na učestalost javljanja klasičnih HAstV može uticati i nedostatak unakrsnog tipskog imuniteta među HAstV, s obzirom da ista deca na određenom području, u kratkom vremenskom intervalu, mogu da dobiju jednu za drugom infekciju, izazvanu različitim tipovima ovih virusa (100,192). Takva pojava je primećena u trogodišnjoj studiji sprovedenoj u Španiji, u kojoj je više od 50% uzoraka sa infekcijom izazvanom HAstV tipovima 1 i 3 bilo dokazano kod dece mlađe od 2 godine, dok su u uzorcima većine dece starije od 3 godine pronađeni HAstV tipovi 4 i 8. Ovaj naveden statistički značajno različit obrazac javljanja tipova HAstV prema starosti, ukazuje na to da imunološka zaštita od najčešćih tipova, stečena ranije u životu, ne pruža nikakvu odbranu od novih tipova ili varijanti HAstV, sa kojima dete dolazi u kontakt nakon toga (192).

U jednom od izabраниh uzoraka za sekvenciranje (uzorak 1) utvrđena je udružena infekcija izazvana astrovirusom i norovirusom. Pojava udruženih infekcija astrovirusa sa nekim drugim virusnim uzročnicima nije neuobičajena i opisana je u nekoliko različitih istraživanja. Udružene infekcije astrovirusa sa rotavirusom javljale su se u rasponu od 0,4 do 1,6% tokom istraživanja sprovedenih u Francuskoj, Indiji i Tajlandu. Opisane su udružene infekcije i sa norovirusom u Japanu (202-205).

Ono što je interesantno je podatak da jedan od izabраниh uzoraka za sekvenciranje (uzorak 1) ima sekvencu, koja je pokazala 100% sličnosti sa sekvencom HAstV 1 izolovanom u školjkama u južnom delu Italije tokom istraživanja o rasprostranjenosti virusa, koji se prenose hranom (186). Ova pojava nije neobična, jer, iako se astrovirusi najčešće prenose direktnim kontaktom, odnosno fekalno-oralnim putem, čest je prenos infekcije i preko kontaminirane vode i hrane. Virusi najčešće kontaminiraju voće, povrće, kao i hranu koja se jede sveža, bez prethodne termičke obrade ili kratko termički obrađena, kao što su školjke i drugi morski plodovi.

Molekularna tipizacija i filogenetska analiza detektovanih norovirusa

Norovirus je jedan od najznačajnijih uzročnika gastroenterokolitisa širom sveta. Najčešći je uzročnik dijareje kod odraslih i drugi po značaju uzročnik dijareje kod dece mlađe od 5 godina, posle rotavirusa, koji je najčešći uzročnik kod dece. U ovom istraživanju norovirus je bio drugi po učestalosti uzročnik dijarealnog sindroma, dok se najčešće javljao kod obolelih osoba starijih od 20 godina. Smatra se da je 60-85% svih epidemija gastroenteritisa uzrokovano norovirusom, posebno na teritoriji SAD, Evropskih država i Japana (92,93). Navedeno je da norovirus u SAD-u, gde spada u najčešće uzročnike dijarealnog sindroma, izaziva 26% hospitalizacija (radi se o težim oblicima bolesti) i 11% smrtnih slučajeva, nakon gastroenterokolitisa izazvanih kontaminiranom hranom. Prema podacima Centra za prevenciju i kontrolu bolesti (CDC) norovirusi su uzročnici u 58% svih oboljenja izazvanih hranom (salata, voće, termički neobrađena hrana i školjke), kao i zagađenom vodom (95).

Za potrebe istraživanja u toku ove doktorske disertacije izabrano je 10 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane noroviruse *real-time RT-PCR* testom. Ovim uzorcima je sekvenciran C region (5' kraj) ORF2 norovirusa. ORF2 region kodira glavni protein kapsida VP1 kod norovirusa. Reprezentativni uzorci su dobijeni od obolelih osoba različite starosti (od 1 do 77 godina). Obolele osobe su imale karakterističnu kliničku sliku virusnog gastroenterokolitisa, sa prisutnom dijarejom, mukom i povraćanjem, kao karakterističnim simptomima norovirusne infekcije. Uglavnom su oboleli lečeni bolnički, iako su dva bolesnika lečena ambulantno (uzorak 1 i 4). Kod jedne polovine reprezentativnih uzoraka radilo se o sporadičnom javljanju infekcije, dok je druga polovina uzoraka uzeta tokom različitih epidemija, izazvanih norovirusom. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom je utvrđeno da sekvenca jednog uzorka pripada genograpi I NoV i genotipu 2 (uzorak 1), a da sekvence devet uzoraka pripadaju genograpi II NoV, pri čemu dva uzorka (uzorak 4 i 5) pripadaju genotipu 1, četiri uzorka (uzorak 2, 7, 8 i 10) pripadaju genotipu 2, jedan uzorak (uzorak 9) pripada genotipu 4 i dva uzorka (uzorak 3 i 6) pripadaju genotipu 17.

Sekvenca NoV iz uzorka stolice obolelog deteta u ovom istraživanju (uzorak 1) pripada NoV genograpi I i tipu 2 (GI.2). To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Southampton virus. Sekvenca uzorka 1 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GI.2 izolovanom kod odraslih osoba sa gastroenteritisom u Kini, sekvencom NoV GI.2 izolovanom kod obolele dece u Grčkoj, kao i 97% sličnost sa sekvencom NoV GI.2 u Belgiji (206).

Sekvence uzoraka 4 i 5 iz ovog istraživanja pripadaju genograpi II NoV i tipu 1 (GII.1). To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Hawaii virus. Sekvenca uzorka 4 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Bugarskoj, Belgiji, Italiji i Španiji, kao i 97% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Nemačkoj

(207-209). Sekvenca uzorka 5 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Brazilu, kao i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.1 izolovanom u Bugarskoj, Nemačkoj, Australiji i Italiji (209-211).

Sekvence uzoraka 2, 7, 8 i 10 iz ovog istraživanja pripadaju genogrupi II NoV i tipu 2 (GII.2). To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Snow Mountain virus. Sekvenca uzorka 2 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Švedskoj, sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Japanu, kao i 97% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Nemačkoj i Kini (212-214). Sekvenca uzorka 7 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Švedskoj i Japanu, kao i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Kini i Nemačkoj (212-215). Sekvenca uzorka 8 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Japanu, kao i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Nemačkoj, Švedskoj i Kini (212-215). Sekvenca uzorka 10 NoV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Francuskoj i Nemačkoj, kao i 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Kini i 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.2 izolovanom u Japanu (213-216).

Sekvenca uzorka 9 iz ovog istraživanja pripada genogrupi II NoV i tipu 4 (GII.4). To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Lordsdale virus. Sekvenca uzorka 9 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 varijanta Sidnej 2012, izolovanom u Kini, 98% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 izolovanom kod dece sa gastroenteritisom u Rusiji, sekvencom NoV GII.4 izolovanom u Grčkoj i Kanadi, 97% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 izolovanom u Bugarskoj, kao i 95% sličnost sa sekvencom NoV GII.4 izolovanom u Mađarskoj (217-220).

Sekvence uzoraka 3 i 6 iz ovog istraživanja pripadaju genogrupi II NoV i tipu 17 (GII.17). To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom NoV GII.17 Kawasaki. Sekvenca uzorka 3 NoV pokazala je 99% sličnost sa sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Sloveniji, Brazilu, Holandiji, Kini i Italiji (91,221,222). Sekvenca uzorka 6 NoV pokazala je 100% sličnost sa sekvencom NoV GII.17 izolovanom u Sloveniji, Brazilu, Holandiji, Italiji i Kini (91,221,222).

Norovirus je vodeći uzročnik epidemija gastroenteritisa širom sveta. Smatra se da je 60-85% svih epidemija gastroenteritisa uzrokovano norovirusom, posebno na teritoriji SAD, Evropskih država i Japana. Navodi se da je kod preko 90% nebakterijskih epidemija utvrđeni uzročnik bio norovirus (92,93,186). U istraživanju tokom ove doktorske teze dobijeni su slični rezultati. U petogodišnjem periodu na teritoriji Vojvodine od 31 epidemije sa dokazanim virusnim uzročnicima norovirus je bio jedini uzročnik u 20 epidemija, a u još 7 je dokazan kao jedan od dva utvrđena virusa (zajedno sa rota ili adenovirusom).

Norovirus se može prenositi na različite načine: direktnim kontaktom (fekalno-oralnim

putem), hranom, vodom, aerosolom kod povraćanja, kao i kuhinjskim površinama, koje su kontaminirane (85). Smatra se da je direktni kontakt najvažniji način prenošenja norovirusa, kako prilikom sporadičnog javljanja bolesti, tako i tokom epidemija (85,223,224). U ovom istraživanju od 27 epidemija u kojima je norovirus dokazan kao uzročnik bolesti, infekcija se širila kontaktnim putem u 20 epidemija. Kontaminirana hrana je, isto tako, često uzrok nastanka norovirusnih epidemija. Hrana može da se kontaminira prilikom gajenja, zalivanja, đubrenja, zatim kontaminiranom vodom i otpadnim materijalom. Infekcija može da nastane unošenjem hrane koja se termički ne obrađuje, a zagađena je od ljudi koji je spremaju (često u restoranima, hotelima, školama, bolnicama, kampovima, brodovima za krstarenje). Infekcija se prenosi i školjkama i morskim plodovima, koji se gaje u kontaminiranoj vodi (26,80). U istraživanju u okviru ove doktorske teze, kontaminirana hrana je bila prisutna kao uzrok nastanka 5 epidemija sa dokazanim norovirusom. U svetu se često opisuju i hidrične epidemije izazvane norovirusima, ali ipak to je ređi način nastanka bolesti (223). U ovom istraživanju, kontaminirana voda nije bila uzrok nastanka nijedne epidemije. Međutim, zbog visoke infektivnosti norovirusa (10 virusnih partikula je dovoljno da izazove bolest), kratke inkubacije i potencijalno dugog perioda infektivnosti (velika količina virusa se izlučuje pre početka simptoma bolesti i nekoliko nedelja posle prestanka bolesti), kao i zbog velike otpornosti norovirusa u spoljašnjoj sredini, često tokom epidemija postoji i više načina širenja infekcije (223,224). Tako, u dva slučaja nastanka epidemija tokom ovog istraživanja, utvrđeno je da je prenošenje infekcije bilo i putem kontaminirane hrane i kontaktnim putem.

Razlikuju se 6 genogrupa norovirusa (GI, GII, GIII, GIV, GV, GVI) i više od 40 genotipova (80). Najvažnije za ljude su genogrupa I, genogrupa II i genogrupa IV, koje mogu da inficiraju ljude (88). Prevalenca genotipova, koji su najčešći uzročnici infekcija, razlikuje se u različitim regijama i populacijama. Pokazalo se, takođe, da se pojedini genotipovi češće prenose na određene načine. Tako se GII.4 genotip češće prenosi direktnim kontaktom osobe sa osobom, dok je kod nekih drugih genotipova češći prenos preko kontaminirane hrane. Genotipovi genogrupe I češće se prenose vodom ili hranom, nego što je to slučaj kod genogrupe II. To može da ukazuje na veću stabilnost genogrupe I na uticaje faktora spoljašnje sredine od genogrupe II (87). U istraživanju, u kojem se ispitala dužina trajanja infektivnosti humanog norovirusa u vodi, 13 dobrovoljaca je u različitim vremenskim intervalima unosilo podzemnu vodu, prethodno kontaminiranu sa norovirusom. Pokazalo se da je NoV GI, koji se nalazio u podzemnim vodama, zadržao infektivnost i nakon dva meseca. RNK NoV GI, koja se nalazila u podzemnim vodama, i dalje se mogla detektovati RT-PCR testom i nakon 588 dana (224,225). To ukazuje na naročito veliku otpornost norovirusa genogrupe I u spoljašnjoj sredini, a posebno u vodi. Pošto norovirus može, isto tako, da se prilagodi faktorima domaćina, koji se razlikuju u zavisnosti od populacije koja je zaražena, kao

što su starost, zdravlje i imunološki status, razlike u epidemiologiji genotipova norovirusa u različitim zajednicama mogu verovatno uticati i na evoluciju genotipova (87).

Uprkos velikoj raznolikosti norovirusa, poslednjih 20 godina samo je mali broj tipova bio uzročnik epidemija (85). Najdominantniji norovirusni genotip, koji je većinom bio uzročnik epidemija, je genotip 4 iz genogrupe II (GII.4). Ispitivanja pokazuju da je ovaj genotip bio uzročnik kod oko 60-90% prijavljenih slučajeva norovirusnog gastroenteritisa. Istraživanja koja su se bavila nadzorom nad norovirusom u različitim zemljama, pokazala su da kod GII.4 genotipa često dolazi do pojave novih antigentskih varijanti. To ukazuje da imunološki pritisak populacije verovatno utiče na evoluciju norovirusa. Važno je naglasiti da se pojava i širenje novih varijanti ovog specifičnog genotipa poklapala sa povećanjem broja prijavljenih norovirusnih epidemija. Razlog zašto baš varijante GII.4 izazivaju velike epidemije, pa i pandemije nije u potpunosti jasan. Istraživanja sugerišu da bi to moglo biti zbog jednog ili kombinacije više sledećih razloga: zbog veće biološke adaptivnosti, zbog mogućnosti vezivanja za veliki broj različitih ćelijskih receptora, zbog brze replikacije i pojave učestalih mutacija, kao i zbog toga što postoji izlučivanje veće količine virusa kod zaraženih pacijenata (85,87,89).

Međutim, u periodu 2014/2015. godine novi genotip norovirusa GII.17 se pojavio kao glavni uzročnik epidemija gastroenteritisa u Kini i Japanu. Od kad se pojavio, NoV GII.17 je u potpunosti zamenio prethodno dominantan GII.4 u pojedinim delovima Azije. Poznato je, međutim, da norovirusi GII.17 genotipa cirkulišu među ljudima oko 37 godina. Prvi NoV GII.17 genotip je dokazan još 1978. godine i od tada GII.17 genotip je sporadično detektovan u Africi, Aziji, Evropi, Severnoj i Južnoj Americi. U zimu 2014/2015. godine genetski slični GII.17 virusi utvrđeni su kao uzročnici 24 od 29 prijavljenih epidemija gastroenteritisa u školama, zabavištima i fabrikama u Kini. Od tada GII.17 genotip je počeo da se učestalije javlja i u drugim delovima sveta: u Australiji, Novom Zelandu, Brazilu, Meksiku, SAD-u, Kanadi, Rusiji, Francuskoj, Holandiji, pa i u zemljama u našem okruženju kao što su Italija, Rumunija, Mađarska i Slovenija (90,91,221,226-228). Nova GII.17 varijanta norovirusa, nazvana Kawasaki 2014, je filogenetski različita od prethodne GII.17 varijante, koja je cirkulisala u 2013. i 2014. godini. Smatra se da je moguće da je ova nova varijanta GII.17 stekla jači epidemijski kapacitet, odnosno, da ima veću biološku adaptivnost, jer može da se vezuje za veliki broj različitih ćelijskih receptora, da se brže replikuje i da je sklona pojavi čestih mutacija, što joj omogućava izbegavanje imunološke odbrane domaćina. Ovo su sve osobine opisane i kod GII.4 genotipa norovirusa, koji je u poslednjih dvadesetak godina bio odgovoran za nastanak 60-90% norovirusnih epidemija. Veliki broj obolelih od novog GII.17 norovirusa se objašnjava i time, što je njegovo prisustvo u populaciji do 2014. godine bilo retko, tako da ne postoji kod većeg broja ljudi u populaciji zaštitni imunitet (90,91,222).

Ono što je interesantno u ovom istraživanju je činjenica da je od deset izabranih reprezentativnih uzoraka, samo u jednom dokazan NoV GII.4 i to kod deteta sa sporadičnim javljanjem bolesti, dok je NoV GII.17 dokazan u dva uzorka, uzeta tokom dve različite epidemije, koje su bile u 2016. godini. Ovaj podatak svakako ne može da znači da je u Srbiji NoV GII.17 zamenio NoV GII.4, kao što neki autori smatraju da se dešava u nekim delovima sveta. Naime, od 231 noro pozitivne osobe, utvrđene u ovom istraživanju, samo je kod deset uzoraka izvršena detaljnija molekularna analiza sekvenciranjem. Ipak, ovaj podatak govori o prisutnosti NoV GII.17 i u našoj sredini.

Kao uzročnici epidemija, pored utvrđenog u dva uzorka NoV GII.17 genotipa, koji su uzeti tokom dve različite epidemije, dokazani su, kao uzročnici u dve epidemije i NoV GII.2, a u jednoj epidemiji NoV GII.1.

Kada se gledaju rezultati sekvenciranja svih reprezentativnih uzoraka, kako onih koji su uzeti od obolelih tokom epidemija, tako i onih koji su uzeti od obolelih kod sporadičnog javljanja bolesti, može se primetiti da je najzastupljeniji bio genotip 2 genogrupe II norovirusa kod 4 obolele osobe. Povećano javljanje NoV GII.2 zabeleženo je u još nekim zemljama sveta. Tako se u Japanu, tokom sezone 2009/2010. godine, jako povećao broj epidemija izazvanih NoV GII.2 genotipom. Najzastupljeniji genotip te sezone u Japanu bio je GII.2 (44.6%), a posle njega GII.4 (39.2%). Većinom je NoV GII.2 genotip bio uzročnik epidemija kod dece i prenosio se direktnim kontaktom. Filogenetskom analizom dela gena, koji kodira sintezu RNK zavisne RNK polimeraze (ORF1) i dela genoma, koji kodira sintezu kapsidnog proteina VP1 norovirusa (ORF2), utvrđeno je da među ovim GII.2 norovirusima, koji su uzrokovali povećani broj epidemija u Japanu, postoje dva genetski različita tipa. Jedan je GII.2p2 tip, kod koga od istog genotipa norovirusa potiču geni i za RNK zavisnu RNK polimerazu i za kapsid virusa. Drugi je GII.2 himera virus (GII.2p16), odnosno, hibridni virus, koji sadrži gene za RNK zavisnu RNK polimerazu (RdRp) od GII.16 genotipa, a gene za kapsidni protein od GII.2 genotipa norovirusa. To sugeriše da je došlo do rekombinacije između ova dva genotipa norovirusa na spoju ORF1 i ORF2 u genomu. Epidemiološki podaci su pokazali da su se epidemije izazvane GII.2 genotipom razlikovale od epidemija izazvanih GII.4 genotipom i to prema starosti obolelih, načinu širenja virusa i mestu nastanka infekcija. Poređenjem sekvenci aminokiselina kapsidnog proteina na osnovu kompletnih kapsidnih gena između GII.2p2 i GII.2p16, utvrđeno je da je kod GII.2p16 tipova došlo do supstitucije i samim tim da imaju četire zamene aminokiselina u P2 domenu. P2 domen kapsidnog proteina ima važnu ulogu u vezivanju za receptore ćelije domaćina, kao i u imunološkoj reaktivnosti domaćina (213). Hibridni GII.2 norovirus (GII.2p16) otkriven je i u Francuskoj i Nemačkoj u sezoni 2016/2017, gde je dovodio do povećanog broja epidemija (215,216). Vršena ispitivanja zastupljenosti norovirusa, pokazala su da

često različiti genotipovi NoV kruže u populaciji tokom istog perioda, što stvara uslove za javljanje rekombinacija među genotipovima. Ova studija je otkrila da su GII.2 sojevi u ljudskim populacijama pokazali drastičnu rekombinaciju i postepenu akumulaciju mutacija, što ukazuje na to da se i svi drugi norovirusi, osim GII.4 NoV, neprekidno menjaju u populaciji (213).

Uzorcima, koji su bili pozitivni na humane noroviruse *real-time RT-PCR* testom tokom ovog istraživanja, sekvenciran je C region (5' kraj) ORF2. Zbog toga što nije sekvenciran ORF1 kod uzorka 2, 7, 8 i 10, koji pripadaju NoV GII.2 genotipu, ne može da se sa sigurnošću utvrdi da li je i kod ovih norovirusa iz Srbije došlo do rekombinacije. Jedino se može reći za uzorak 10, čija sekvenca 5' kraja ORF2 je pokazala 100% sličnost sa sekvencom ovog dela genoma NoV GII.2, izolovanom u Francuskoj, Nemačkoj, Kini, Japanu i Australiji (215,216), pri čemu su svi ovi izolati rekombinantni virusi GII.2p16, pa se može posumnjati da je i ovaj uzorak 10 isto rekombinantan virus. Međutim, ni za ovaj uzorak 10 ne može se sa sigurnošću to potvrditi.

Zbog sve češće pojave rekombinacija kod norovirusa, u poslednje vreme se preporučuje da se sekvenciraju i regije gena za sintezu kapsidnog proteina i regije gena za sintezu RNK zavisne RNK polimeraze. Naime, nekada genotipizacija, bazirana samo na kapsidnoj regiji, nije dosledna, zbog rekombinacije NoV, naročito jer je mesto rekombinacije obično u samoj blizini spoja ORF1 i ORF2. Takođe, predloženo je da se za noroviruse uvede dvostruka nomenklatura, koja koristi sekvence ORF1 (RdRp) i ORF2 (VP1), jer bi se na taj način mogli prepoznati rekombinantni virusi, što je veoma značajno u epidemiološkom nadzoru nad norovirusima (229).

Molekularna tipizacija i filogenetska analiza detektovanih rotavirusa

Rotavirus je najznačajniji uzročnik gastroenterokolitisa kod odojčadi i male dece širom sveta. Procenjuje se da broj smrtnih slučajeva u svetu zbog rotavirusne infekcije iznosi 500 hiljada godišnje. Tokom ovog istraživanja rotavirusi su bili najčešće zastupljeni uzročnici gastroenteritisa. Posle uvođenja vakcine protiv rotavirusa 2006. godine, opao je broj obolelih i smrtnih slučajeva u SAD-u (67). Više od 90% rotavirusnih infekcija u svetu je izazvano virusima iz grupe A (39).

Za potrebe istraživanja u toku ove doktorske disertacije izabrano je 10 reprezentativnih uzoraka, koji su bili pozitivni na humane rotaviruse *real-time RT-PCR* testom. Svi reprezentativni uzorci pripadali su grupi A rotavirusa. Zbog dvostruke nomenklature, koja postoji kod rotavirusa, ovim uzorcima sekvencirani su gen 9 i deo gena 4. Gen 9 kodira VP7 protein na površini virusa, na osnovu koga se vrši određivanje G tipa rotavirusa grupe A (G tipizacija). Gen 4 kodira VP4 protein na površini virusa, na osnovu koga se vrši određivanje P tipa rotavirusa grupe A (P tipizacija). Reprezentativni uzorci su dobijeni od obolelih osoba starosti od 1 do 86 godina. Obolele osobe su imale karakterističnu kliničku sliku virusnog gastroenterokolitisa, sa prisutnom dijarejom,

povraćanjem i povišenom temperaturom, kao karakterističnim simptomima rotavirusne infekcije. Uglavnom su oboleli lečeni bolnički, iako je jedno dete lečeno ambulantno (uzorak 7). Kod svih reprezentativnih uzoraka radilo se o sporadičnom javljanju infekcije, osim kod uzorka 3, koji je uzet od obolele osobe tokom epidemije izazvane rotavirusom. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom je utvrđeno da sekvence svih uzoraka pripadaju grupi A rotavirusa, pri čemu četiri uzorka (uzorak 2, 3, 6 i 10) pripadaju genotipu G1P[8], tri uzorka (uzorak 4, 7 i 9) pripadaju genotipu G2P[4], dva uzorka (uzorak 1 i 5) pripadaju genotipu G3P[8], a preostali uzorak (uzorak 8) pripada genotipu G9P[8].

Sekvence gena 9 izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 2, 3, 6 i 10, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu G1. To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom Wa. Sekvence uzoraka 2 i 6 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Turskoj, Pakistanu, Indiji i SAD-u (230,231). Sekvenca uzorka 3 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Japanu i Rusiji, kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Argentini i Tajlandu (232,233). Sekvenca uzorka 10 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom u Turskoj i Indiji, kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G1 izolovanom na Kubi (230,234).

Sekvence gena 9 izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 4, 7 i 9, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu G2. To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom DS-1. Sekvenca uzorka 4 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G2 izolovanom u SAD-u i Južnoj Koreji, kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G2 izolovanom u Mađarskoj, Italiji i Japanu (235-238). Sekvence uzoraka 7 i 9 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA G2 izolovanom u Mađarskoj, Rusiji, Belgiji i Kini (236,239-241).

Sekvence gena 9 izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 1 i 5, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu G3. To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom RV3. Sekvenca uzorka 1 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G3 izolovanom u Španiji, Mađarskoj, Turskoj i Japanu (230,242-244). Sekvenca uzorka 5 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G3 izolovanom u Nemačkoj, Mađarskoj, Australiji i Španiji (242,243,245,246).

Sekvenca gena 9 izolata RVA iz uzorka stolice obolele osobe, označenog brojem 8, pripada grupi A rotavirusa i tipu G9. To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom 116E. Sekvenca uzorka 8 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA G9 izolovanom u Kini, kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA G9 izolovanom u Rusiji, Japanu i SAD-u (247,248).

Sekvence gena 4 izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 1, 2, 3, 5, 6, 8 i 10, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu P[8]. To je potvrđeno i na osnovu sličnosti sa

referentnim izolatom Wa. Sekvence uzoraka 2 i 10 RVA pokazale su 100% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Turskoj, Italiji i Rusiji, kao i 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Sloveniji, Belgiji i Nemačkoj (230,240,249-251). Sekvence uzoraka 1, 3 i 5 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Španiji, Japanu, Mađarskoj, Australiji i Tajlandu (232,242,243,246,252). Sekvenca uzorka 6 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Rusiji, Italiji, Turskoj, Nemačkoj i Belgiji (230,240,249,251). Sekvenca uzorka 8 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Brazilu, SAD-u i Kini, kao i 98% sličnost sa sekvencom RVA P[8] izolovanom u Španiji i Mađarskoj (242,243,253-255).

Sekvence gena 4 izolata RVA iz uzoraka stolice obolelih osoba, označenih brojem 4,7 i 9, pripadaju grupi A rotavirusa i tipu P[4]. To je i potvrđeno na osnovu sličnosti sa referentnim izolatom DS-1. Sekvenca uzorka 4 RVA pokazala je 99% sličnost sa sekvencom RVA P[4] izolovanom u Brazilu, Kini, Indiji i Rusiji (256-258). Sekvence uzoraka 7 i 9 RVA pokazale su 99% sličnost sa sekvencom RVA P[4] izolovanom u epidemiji gastroenteritisa u Italiji, Turskoj, Mađarskoj i Belgiji (230,236,240,259).

I pored velike genske i antigenske raznovrstnosti rotavirusa, poslednje tri decenije širom sveta bolesti kod ljudi je izazivao samo mali broj genotipova rotavirusa: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8]. Nedavno se povećala učestalost i tipova G9P[8] i G12P[8]. Pomenuti tipovi rotavirusa uzrokuju 80-90% svih rotavirusnih infekcija u Severnoj Americi, Evropi i Australiji (52,260,261). Za razliku od pomenutih delova sveta, u zemljama Afrike, Azije i Južne Amerike, preovlađuju neki drugi genotipovi kao što su G5, G6 i G8 (262-264).

U okviru istraživanja tokom ove doktorske disertacije, među izabranih 10 reprezentativnih uzoraka pozitivnih na rotavirus, najzastupljeniji genotip rotavirusa bio je G1P[8] (u 4 uzorka), zatim G2P[4] (u 3 uzorka), zatim G3P[8] (u 2 uzorka) i na kraju G9P[8] (u jednom uzorku). Iako se radi o malom broju uzoraka, na osnovu kojih se ne mogu izvoditi potpuni zaključci, slični rezultati dobijeni su i u istraživanju sprovedenom u zemljama centralne i jugoistočne Evrope. Naime, sakupljeni su uzorci stolica dece sa teškim oblicima gastroenteritisa u dvogodišnjem periodu u Češkoj, Sloveniji, Hrvatskoj, Albaniji i Bugarskoj, a zatim je kod uzoraka pozitivnih na rotavirus rađena genotipizacija. Tipovi rotavirusa G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] i G9P[8] bili su uzročnici bolesti u 82.6% u Bugarskoj, 77.7% u Češkoj i 71.2% u Sloveniji, dok su u Hrvatskoj dokazani u 59.9% i u Albaniji kod 50.0% obolelih. Dakle, ovi tipovi rotavirusa bili su zastupljeni u nešto nižem procentu u Hrvatskoj i Albaniji (265).

Postoji velika raznovrsnost „divljih“ tipova rotavirusa, koji cirkulišu širom sveta. Dominantni tipovi, koji uzrokuju teške oblike bolesti, menjaju se iz godine u godinu i u različitim

zemljama. Ovakva raznovrsnost rotavirusa nastaje preko nekoliko mehanizama: (1) akumulacijom tačkastih mutacija (genetski drift), koje mogu dovesti do antigenskih promena virusa (2) rekombinacijom, koja dovodi do pojave virusa sa novim genetskim i antigenskim karakteristikama, što može nastati kao rezultat razmene delova genoma između 2 humana tipa, ili humanog i životinjskog tipa (3) direktnim prenošenjem životinjskog virusa na čoveka i (4) rearanžiranjem gena u genomu, koji pre svega kodiraju nestrukturane proteine (1,52,266). Primarna rotavirusna infekcija kod male dece ne pruža imunitet od reinfekcije, ali štiti od razvoja klinički teških oblika bolesti tokom reinfekcije rotavirusom. Ova pojava je iskorišćena kao osnova za primenu oralnih vakcina protiv rotavirusa. Rotavirusne vakcine, RotaTeq i Rotarix, pružaju odličnu zaštitu od nastanka teškog rotavirusnog gastroenteritisa. Rotarix, monovaentna vakcina, sadrži atenuisani soj rotavirusa humanog porekla G1P[8]. RotaTeq, pentavalentna vakcina, sastoji se od 5 sojeva humanih i govedih rekombinantnih virusa, od kojih svaki nosi gen humanog rotavirusa, koji kodira VP7 protein G1, G2, G3 ili G4 tipa ili gen humanog rotavirusa za VP4 protein P[8] tipa. Rotavirusne vakcine pružaju specifičnu zaštitu od nastanka teških oblika bolesti, uzrokovanih sa 5 najzastupljenijih tipova rotavirusa (G1, G2, G3, G4 i G9) (266). Međutim, tokom proteklih deset godina dolazi do češćeg javljanja retkih ili neuobičajenih G (VP7) genotipova, koji izazivaju teške oblike bolesti kod dece. Tokom nadzora nad rotavirusnim infekcijama u Australiji, Brazilu, Mađarskoj, Indiji, Nigeriji, Tajlandu i SAD-u identifikovani su genotipovi G5, G6, G8, G10 i G12 kao uzročnici teških gastroenteritisa kod dece. Iako su ovi genotipovi u manjem procentu zastupljeni na globalnom nivou, u nekim regijama Indije, Afrike i Brazila, oni se javljaju u mnogo većem procentu i mogu predstavljati problem (266-270). Dakle, raznovrsnost genotipova rotavirusa može imati značajan uticaj na razvoj vakcine i njenu uspešnu implementaciju. Naročito ako tipovi rotavirusa, za koje vakcine ne pružaju zaštitu, postanu uobičajeni, odnosno značajni uzročnici bolesti, bilo na globalnom, ili na regionalnom nivou. Može se desiti da usled vakcinacije dođe do povećanja imunološkog pritiska na „divlje“ ili neuobičajene tipove rotavirusa, koji cirkulišu u populaciji (na koje vakcina ne deluje), menjajući na taj način ravnotežu među rotavirusima, što dovodi do njihove evolucije. Isto tako, nekoliko rotavirusnih genotipova, za koje se veruje da su životinjskog porekla, detektovani su u malom broju kod dece sa akutnim gastroenteritisom. Genotipovi G6, G8 i G10 su glavni genotipovi govedih rotavirusa, a svi su sporadično identifikovani kod dece u većini regiona sveta. Genotipovi svinje G5 i G11, takođe, su sporadično izolovani kod dece sa akutnim gastroenteritisom. Sposobnost rotavirusa da se rekombinuje može dovesti do nastanka atipičnih ili novih rotavirusa, kod kojih je jedan ili više gena razmenjeno između humanih i animalnih virusa, ili putem prenošenja virusa među vrstama, odnosno prenosa

životinjskih rotavirusa na ljude. Opasnost od ove pojave naročito postoji u zemljama u razvoju, gde deca često postaju zaražena sa više tipova rotavirusa istovremeno (266).

Zbog velike varijabilnosti rotavirusa i sposobnosti rekombinacije u različitim delovima genoma, binarni sistem diferencijacije ima nedostatak. Naime, na osnovu binarnog sistema diferencijacije uzimaju se u obzir samo G i P tipovi rotavirusa, pri čemu se ignorišu svi ostali virusni geni, koji kodiraju strukturne i nestrukturne proteine. Pošto binarni sistem ne pruža informacije potrebne za potpunu procenu genetske raznovrsnosti i evolucione dinamike rotavirusa, ne može se zaključiti ni o odnosima različitih cirkulišućih tipova rotavirusa, koji, ako se nađu u istoj ćeliji, mogu da dovedu do rekombinacije u različitim delovima genoma, a ne samo u genima koji su odgovorni za sintezu VP4 i VP7 proteina. Ove rekombinacije virusa igraju ključnu ulogu u raznovrsnosti rotavirusa u prirodi. Zbog toga je „Radna grupa za rotavirusnu sistematizaciju“ dala predlog za stvaranje novog sistema diferencijacije, zasnovanog na analizi sekvenci svih gena (segmenata) u genomu. Na osnovu sekvence svakog segmenta u genomu virusa, može se vršiti podela na genotipove. Tako segmenti genoma za VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 određuju tipove G_x-P_[x]-I_x-R_x-M_x-A_x-N_x-T_x-E_x-H_x (x=broj koji predstavlja određeni tip). Ovaj sistem za diferencijaciju među rotavirusima, koji se zasniva na dokazivanju svih segmenata virusnog genoma, omogućava da se na osnovu promena koje nastaju u genomu virusa, bolje prepoznaju geni, koji imaju uticaj na ograničavanje umnožavanja virusa u mogućim vrstama domaćina, koji utiču na replikaciju i virulenciju rotavirusa, a na taj način služe i za proučavanje rotavirusne epidemiologije i evolucije (271,272).

Bitna činjenica je da su svi virusi, uzročnici gastrointestinalnog sindroma, veoma otporni u spoljnoj sredini. Zato mogu da duže ostanu infektivni. Ne izazivaju vidljive promene u izgledu hrane u kojoj su prisutni. Isto tako, dovoljna je mala količina virusa za nastanak infekcije i njeno širenje u epidemiju. Sve to potvrđuje značaj virusnog gastrointestinalnog sindroma i to u svim starosnim grupama obolelih. Uz najnovije podatke, dobijene preciznim molekularnim analizama virusnih genoma (sekvenciranjem), utvrđeno je da se sve češće javljaju promene kod ovih virusa: mutacije, rekombinacije, antigenski driftovi itd. To ima za posledicu činjenicu da se još više smanjuje mogućnost stvaranja imuniteta u populaciji. Prema tome, virusni gastrointestinalni sindrom i dalje ostaje značajan problem u svetu. Vakcina za sada postoji samo za rotavirus. Priprema vakcine protiv norovirusa je u toku i to je značajno, jer su norovirusi najčešći uzročnici epidemija. Svi ovi podaci potvrđuju da je neophodno napraviti tačan program, koji će da obezbedi brzu i preciznu dijagnostiku. „Zlatni standard“ za dokazivanje ovih virusa je molekularna dijagnostika, odnosno, *real-time PCR* test. Odmah nakon postavljene dijagnoze, potrebno je izvršiti brzu nadoknadu vode i elektrolita, uz primenu ostalih mera simptomatske terapije. To je naročito

bitno da se brzo sprovede kod male dece, starih, hronični bolesnika i imunodeficitarnih osoba, a istovremeno je neopodno brzo preduzimanje svih protivepidemijskih postupaka.

8.0. Zaključci

1. U petogodišnjem periodu na teritoriji Vojvodine *real-time PCR* metodom na uzorku od 1003 bolesnika sa simptomima akutnog gastroenterokolitisa, infekcija rota, noro, astro i adenovirusima dokazana je kod 709 obolelih (70,69%).
2. Rotavirusna infekcija je utvrđena kod 28,81% obolelih, norovirusna infekcija kod 23,03%, astrovirusna infekcija kod 2,29% pregledanih bolesnika, a adenovirusna infekcija kod 13,36% obolelih. Udružena infekcija sa dva virusa u uzorcima stolice utvrđena je kod 3,19% bolesnika. Statistički značajno najviše ovih infekcija dokazano je 2015. godine.
3. Statistički značajno najviše pacijenata zaraženih rotavirusom bilo je kod dece uzrasta do 5 godina (38,90%), ali česte su bile i kod dece stare 6 do 14 godina (24,83%).
4. Norovirusne infekcije dijagnostikovane su statistički značajno češće kod odraslih osoba starijih od 20 godina (36,63%).
5. Astrovirusne infekcije su dijagnostikovane samo kod dece uzrasta do 5 godina (u 2,44%) i 6 do 14 godina (6,90%).
6. Adenovirusne infekcije su statistički značajno najčešće dokazane kod dece starosti 6 do 14 godina (kod 17,24%) i kod dece uzrasta do 5 godina (16,70%).
7. Analizom podataka dobijenih Vesikari metodom, dokazano je da je statistički značajno više pacijenata sa teškom kliničkom slikom bilo kod dece uzrasta do 5 godina.
8. Oboleli od rotavirusne infekcije imali su statistički značajno težu kliničku sliku, sa statistički značajno češće utvrđenom povišenom temperaturom i bolest je statistički značajno duže trajala kod ovih bolesnika.
9. Muka i povraćanje su utvrđeni statistički značajno češće kod bolesnika sa norovirusnom infekcijom u odnosu na osobe obolele od drugih virusnih uzročnika dijarealnog sindroma.
10. Norovirus je statistički značajno najčešće bio uzročnik epidemija (kod 43,29% pregledanih osoba). Epidemijsko javljanje bolesti bilo je statistički značajno najčešće kod najstarijih bolesnika, starih 50 i više godina (kod 71,43% obolelih).

11. Sporadične infekcije statistički značajno najčešće su se javljale kod dece do 5 godina (kod 86,30%), a bile su statistički značajno češće i kod dece uzrasta 6 do 14 godina (kod 73,45%).
12. Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci detektovanih adenovirusa, pokazala je pripadnost grupi F i tipovima 40 i 41, kao i grupi C tipu 2.
13. Sekvencirani i molekularno tipizirani izolati astrovirusa pripadaju grupi klasičnih astrovirusa i tipovima 1, 4 i 5.
14. Izolati norovirusa, koji su sekvencirani i molekularno tipizirani, pripadaju genograpi I tipu 2, i genograpi II tipovima 1, 2, 4 i 17.
15. Filogenetskom analizom nukleotidnih sekvenci izolata rotavirusa utvrđena je pripadnost grupi A i tipovima G1P[8], G2P[4], G3P[8] i G9P[8].
16. Dve sekvence adenovirusa tipa 41 iz uzoraka stolice obolele dece u ovom istraživanju (od kojih je jedan uzorak uzet tokom epidemije) pokazale su 100% poklapanje sa sekvencom adenovirusa izolovanom iz reke Dunav u Novom Sadu, a sekvenca adenovirusa tipa 40 iz uzorka stolice obolelog deteta pokazala je 100% poklapanje sa sekvencom adenovirusa izolovanim iz Paličkog jezera.
17. Predloženi algoritam za dijagnostiku virusnih uzročnika gastrointestinalnog sindroma preporučuje da se „brzi testovi“ koriste u slučaju da postoji epidemija. Svaki negativan nalaz zahteva proveru molekularnom dijagnostikom. U sporadičnim slučajevima metod izbora je molekularna dijagnostika. Detaljna analiza genoma virusa ima epidemiološki i klinički značaj (utvrđivanje početka infekcije, načina širenja itd.)

9.0. Literatura

1. Svensson L, Desselberger U, Estes MK, Greenberg HB. Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis. Academic Press; 2016.
2. Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17(5):461-9.
3. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(4):247-62.
4. WHO. The top 10 causes of death. Fact sheet [Internet]. 2011 [cited 2013]; Available from: [http:// who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/)
5. World Health Organization. Ten leading causes of deaths in 2015. [cited 2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>
6. Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):90-6.
7. Oude Munnink BB, van der Hoek L. Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. *Viruses.* 2016;8(2). pii: E42.
8. Thielman N M, Guerrant R L. Acute infectious diarrhea. *New England Journal of Medicine* 2004; 350(1):38-47.
9. Kuljić-Kapulica N, Đurić-Petković D. Virusni gastroenterokolitis. *Medical Data* 2012; 4(4): 429-434.
10. Vuletić B, Obradović S, Stojkovic-Andjelković A, Igrutinović Z, Radlović P. Rotavirus gastroenteritis. *Srp Arh Celok Lek.* 2006;134(3-4):166-9.
11. Parashar UD, Dow L, Fankhauser RL, Humphrey CD, Miller J, Ando T et al. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiology & Infection* 1998;121(3):615-21.
12. Desselberger U, Gray J. Viral gastroenteritis. *Medicine* 2013; 41(12):700-4.
13. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565-72.
14. Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM et al. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol.* 1999 Sep;37(9):3055-8.
15. Radlović N, Milosavljević S, Deura L, Andrejić B, Paripović V, Jovanović I et al. Rotavirus gastroenteritis in children: our clinical experience. *G Mal Infett Parassit* 1990;42:683-5

16. Eckardt AJ, Baumgardt DC. Viral gastroenteritis in adults. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2011; 6(1):54-63
17. Rogers M, Weinstock DM, Eagan J, Kiehn T, Armstrong D, Sepkowitz KA. Rotavirus outbreak on a pediatric oncology floor: Possible association with toys. *Am J Infect Control.* 2000;28(5):378-80.
18. Michel A, Fitzgerald R, Whyte D, Fitzgerald A, Beggan E, O'Connell N et al. Norovirus outbreak associated with a hotel in the west of Ireland, 2006. *Euro Surveill.* 2007;12(7):E11-2
19. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y et al. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* 2014;58(9):536-9.
20. Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ et al. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis.* 1999;180(2):514-7.
21. Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN et al. Outbreaks of Acute Gastroenteritis on Cruise Ships and on Land: Identification of a Predominant Circulating Strain of Norovirus—United States, 2002. *J Infect Dis.* 2004;190(1):27-36.
22. Kuo HW, Schmid D, Schwarz K, Pichler AM, Klein H, König C et al. A non-foodborne norovirus outbreak among school children during a skiing holiday, Austria, 2007. *Wien Klin Wochenschr.* 2009;121(3-4):120-4.
23. Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM et al. A Foodborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses: First Molecular Traceback to Deli Sandwiches Contaminated during Preparation. *J Infect Dis.* 2000;181(4):1467-70.
24. Marshall JA, Bruggink LD, Sturge K, Subasinghe N, Tan A, Hogg GG. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(1):67-71.
25. Center for Disease Control and Prevention. World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe [Internet]. 2015 [cited 2016]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>
26. Food and Drug Administration. Viruses. In: *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, Second Edition.* Food and Drug Administration; 2012. p. 167-87.
27. WHO-Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Disease. Five keys to safer food manual. WHO; 2006.

28. Cliver DO. Control of viral contamination of food and environment. *Food and Environmental Virology* 2009; 1(1):3-9.
29. Seymour I J, Appleton H. Foodborne viruses and fresh produce. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91(5):759-73.
30. Jerant-Patić V. *Medicinska virusologija*. 2nd ed. Novi Sad: Ortomediks; 2007.
31. Krstić Lj. *Medicinska virusologija*. Beograd: Čigoja; 2001.
32. American Public Health Association. *Control of Communicable Diseases Manual*. 19th edition. Washington:APHA Press; 2008.
33. Radovanović Z. Rotavirusne infekcije. U: Petrović V, urednik. *Imunizacija protiv zaraznih bolesti*. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2015. p. 143–6.
34. Oh DY, Gaedicke G, Schreier E. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol*. 2003;71(1):82-93.
35. Silva PA, Stark K, Mockenhaupt FP, Reither K, Weitzel T, Ignatius R et al. Molecular characterization of enteric viral agents from children in northern region of Ghana. *J Med Virol*. 2008;80(10):1790-8.
36. Lorrot M, Bon F, El Hajje MJ, Aho S, Wolfer M, Giraudon H et al. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30(3):361-8.
37. Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khélifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K et al. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1349-55.
38. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7841):1281-3
39. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, et al, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins; 2013. p. 1348–401.
40. Hung T, Chen GM, Wang CG, Yao HL, Fang ZY, Chao TX et al. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*. 1984;1(8387):1139-42.
41. Fang ZY, Ye Q, Ho MS, Dong H, Qing S, Penaranda ME et al. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J Infect Dis*. 1989;160(6):948-53.
42. Alam MM, Pun SB, Gauchan P et al. The First Identification of *Rotavirus B* from Children and Adults with Acute Diarrhoea in Kathmandu, Nepal. *Tropical Medicine and Health*. 2013;41(3):129-134.

43. Chitambar SD, Lahon A, Tatte VS et al. Occurrence of group B rotavirus infections in the outbreaks of acute gastroenteritis from western India. *The Indian Journal of Medical Research*. 2011;134(3):399-400.
44. Sanekata T, Ahmed MU, Kader A, Taniguchi K, Kobayashi N. Human Group B Rotavirus Infections Cause Severe Diarrhea in Children and Adults in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(5):2187-2190.
45. Peñaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P, Taylor DN, Likanonsakul S et al. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *J Infect Dis*. 1989;160(3):392-7.
46. Oishi I, Yamazaki K, Minekawa Y. An Occurrence of Diarrheal Cases Associated with Group C Rotavirus. *Microbiol Immunol*. 1993;37(6):505-9.
47. Jiang B, Dennehy PH, Spangenberg S, Gentsch JR, Glass RI. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis*. 1995;172(1):45-50.
48. Sánchez-Fauquier A, Roman E, Colomina J, Wilhelmi I, Glass RI, Jiang B. First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch Virol*. 2003;148(2):399-404.
49. Matsumoto K, Hatano M, Kobayashi K, Hasegawa A, Yamazaki S, Nakata S et al. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *J Infect Dis*. 1989;160(4):611-5.
50. Caul EO, Ashley CR, Darville JM, Bridger JC. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *J Med Virol*. 1990;30(3):201-5.
51. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*. 2004;101(1):67-81.
52. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res*. 2014;190:75-96.
53. McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* 2010; 397(2):587-99.
54. Liu M, Mattion NM, Estes MK. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* 1992; 188(1):77-84.
55. Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R et al. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* 2008; 16(11):1678-88.
56. Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* 1996; 70(9):5832-9.

57. Zvizdić Š, Hamzić S, Tandir S. Uloga nestrukturnog rotavirusnog proteina 4 u uzrokovanju akutnog gastroenteritisa. *Medarh* 2007; 61(1):22-5.
58. Jain S, Vashist J, Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine*. 2014;32(27):3367-78.
59. Greenberg H, McAuliffe V, Valdesuso J, et al. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983; 39(1):91-9.
60. Hoshino Y, Gorziglia M, Valdesuso J, et al. An equine rotavirus (FI-14 strain) which bears both subgroup I and subgroup II specificities on its VP6. *Virology* 1987;157(2):488-96.
61. Svensson L, Grahnquist L, Pettersson CA, et al. Detection of human rotaviruses which do not react with subgroup I- and II-specific monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1988;26(6):1238-40.
62. Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S, et al. Production of subgroup-specific monoclonal antibodies against human rotaviruses and their application to an enzyme-linked immunosorbent assay for subgroup determination. *J Med Virol* 1984;14(2):115-25.
63. Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011;156(8):1397-413.
64. Esona MD, Gautam R. Rotavirus. *Clin Lab Med*. 2015;35(2):363-91.
65. WHO. Global rotavirus information and surveillance bulletin. Reporting period: January through December 2010. World Health Organization, Volume 4, 2011.
66. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005;15(1):29-56.
67. Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus. In: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S, eds. 13th ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2012. p. 311-23.
68. Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. *J Med Virol* 2004;73(1):118-22.
69. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, Piedra PA, Conner ME. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* 2007; 4(4):e121.
70. Ramig RF. Systemic rotavirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5(4):591-612.

71. Dickey M, Jamison L, Michaud L, Care M, Bernstein DI, Staat MA. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(4):318-321.
72. Rath BA, Gentsch J, Seckinger J, Ward K, Deputy S. Rotavirus encephalitis with basal ganglia involvement in an 8-month-old infant. *Clin Pediatr (Phila)*. 2013;52(3):260-4.
73. Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JN. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*. 2009;38(6):1487-96.
74. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin of the World Health Organization*. 1990;68(2):171-7.
75. Bishop RF. Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:119-28.
76. Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(2):91-9.
77. Gray J, Iturriza-Gómara M. Rotaviruses. In: Stephenson JR, Warnes A, eds. *Diagnostic Virology Protocols, Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 2011. p. 325-55.
78. WHO. *Manual of rotavirus detection and characterization methods*. WHO; 2009.
79. Green KY. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA et al., eds. *Fields virology*, 6th ed. Philadelphia: Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins; 2013. p. 582–608.
80. Robilottia E, Deresinska S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev*. 2015; 28(1):134-64.
81. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10:1075–81.
82. Zahorsky J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr*. 1929;46:391–5.
83. Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 2):278-91.
84. Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;253(1):1-8.
85. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2009; 361(18):1776-85.
86. Richardson C, Bargatze RF, Goodwin R, Mendelman PM. Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(2):155-67.
87. de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Jul;14(7):421-33.
88. Lopman BA, Vinjé J, Glass RI. Noroviruses, Sapoviruses, and Astroviruses. In: Kaslow RA, Stanberry LR, Le Duc JW, eds. *Viral Infections of Humans - Epidemiology and Control*. Springer US; 2014. p. 479-99.

89. Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD et al. Mechanisms of GII.4 Norovirus Persistence in Human Populations. *PLoS Med.* 2008;5(2):e31.
90. De Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill.* 2015;20(26). pii: 21178.
91. Chan MCW, Hu Y, Chen H, Podkolzin AT, Zaytseva EV, Komano J et al. Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014-2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(8):1350-4.
92. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 2009; 44(1): 1–8.
93. Vantarakis A, Mellou K, Spala G, Kokkinos P, Alamanos Y. A gastroenteritis outbreak caused by noroviruses in Greece. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8(8): 3468–78.
94. Lopman B, Armstrong B, Atchison C, Gray JJ. Host, weather and virological factors drive norovirus epidemiology: time-series analysis of laboratory surveillance data in England and Wales. *PLoS One* 2009; 4(8):e6671.
95. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Multisite outbreak of norovirus associated with a franchise restaurant - Kent County, Michigan, May 2005. *MMWR* 55:395-7.
96. Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982;72:1329–32.
97. Atmar RL, Neill FH, Le Guyader FS. Detection of Human Caliciviruses in Fecal Samples by RT-PCR. In: Stephenson JR, Warnes A, eds. *Diagnostic Virology Protocols, Methods in Molecular Biology.* Humana Press; 2011. p. 39-50.
98. Appleton H, Higgins PG. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1975; i:1297. (Letter.).
99. Madeley CR. Epidemiology of gut viruses. In: Farthing CF, editor. *Viruses and the gut.* Smith, Kline & French Laboratories Ltd.; 1989. p. 5–15.
100. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human Astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews.* 2014;27(4):1048-74.
101. Willcocks MM, Ashton N, Kurtz JB, Cubitt WD, Carter MJ. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J. Virol.* 1994; 68:6057–8.
102. Mendez E, Murillo A, Velazquez-Moctezuma R, Burnham A, Arias C. Replication cycle of Astroviruses. In: Schults-Cherry S, ed. *Astrovirus Research: essential ideas, everyday impacts, future directions, vol 1.* New York: Springer; 2012. p. 19–45.
103. Monroe SS, Carter MJ, Herrmann JE, Kurtz JB, Matsui SM. Astroviridae. In: Murphy FA, Bishop DHL, Ghabrail SA, Jarvis AW, Martielli GP et al., eds. *Virus taxonomy: classification*

- and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna: Springer-Verlag; 1995. p. 364–84.
104. Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Viol. J.* 2008;5:117.
 105. Finkbeiner SR, Le BM, Holtz LR, Storch GA, Wang D. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15:441–4.
 106. Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, Kang G, Wang D. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Viol. J.* 2009;6:161.
 107. Medici MC, Tummolo F, Calderaro A, Elia G, Banyai K. 2014. MLB1 astrovirus in children with gastroenteritis, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20:169–70.
 108. Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J. Gen. Virol.* 2009;90:2965–72.
 109. Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J. Virol.* 2009;83:10836–9.
 110. Wang Y, Li Y, Jin Y, Li DD, Li X, Duan ZJ. Recently identified novel human astroviruses in children with diarrhea, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2013;19:1333–5.
 111. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. [cited 2017]; Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/248/astroviridae-figures
 112. Guix S, Bosch A, Pintó RM. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol.* 2005; 41(2):103-5.
 113. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:570-3.
 114. Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T Jr, Hilleman MR et al. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 1956;124:119-20.
 115. Farkas T, Jiang X. Rotaviruses, Caliciviruses, Astroviruses, Enteric Adenoviruses, and Other Diarrheic Viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 1453-69.
 116. Benevento M, Di Palma S, Snijder J, et al. Adenovirus Composition, Proteolysis, and Disassembly Studied by In-depth Qualitative and Quantitative Proteomics. *The Journal of Biological Chemistry.* 2014; 289(16):11421-30.

117. Saha B, Wong CM, Parks RJ. The Adenovirus Genome Contributes to the Structural Stability of the Virion. *Viruses*. 2014;6(9):3563-83.
118. Ahi YS, Mittal SK. Components of Adenovirus Genome Packaging. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1503.
119. Mlinarić-Galinović G, Žmak Lj. Adenovirusi. U: Kalenić S, urednik. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 365–71.
120. Hakkarainen T, Hemminki A. Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes. *Gene Ther Mol Biol* 2005;9:153-8.
121. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. [cited 2017]; Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/93/adenoviridae
122. Wold WSM, Ison MG. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA et al., eds. *Fields virology*, 6th ed. Philadelphia: Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins; 2013. p. 1732-67.
123. Brown M, Grydsuk JD, Fortsas E, Petric M. Structural features unique to enteric adenoviruses. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:301-7.
124. Zaghoul MZ. Adenovirus serotypes (40, 41) as a cause of gastroenteritis. *Air Water Borne Dis*. 2012;1(2)
125. Ferreira CE, Raboni SM, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, Almeida SM. Viral acute gastroenteritis: clinical and epidemiological features of co-infected patients. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(3):267-72.
126. Tran A, Talmud D, Lejeune B, Jovenin N, Renois F, Payan C et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1943-6.
127. Mousavi Nasab SD, Sabahi F, Makvandi M, Mirab Samiee S, Nadji SA, Ravanshad M. Epidemiology of Rotavirus-Norovirus Co-Infection and Determination of Norovirus Genogrouping among Children with Acute Gastroenteritis in Tehran, Iran. *Iran Biomed J*. 2016 Nov;20(5):280-6.
128. Akan H, İzbirak G, Gürol Y, et al. Rotavirus and adenovirus frequency among patients with acute gastroenteritis and their relationship to clinical parameters: a retrospective study in Turkey. *Asia Pacific Family Medicine*. 2009;8(1):8.
129. Sidoti F, Rittà M, Costa C, Cavallo R. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2015;9(06):551-61.

130. Jerant-Patić V. Praktikum iz Imunologije i virusologije. Novi Sad: Ortomediks; 2008
131. Jerant-Patić V, Patić A. Virusološka dijagnostika - savremene mogućnosti, metode i interpretacija rezultata. U: Jerant Patić V, urednik. Virusologija na početku XXI veka. Novi Sad: Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva; 2014. p. 83–103.
132. Marshall JA, Bruggink LD. Laboratory diagnosis of norovirus. Clin Lab. 2006;52(11-12):571-81.
133. Weaver RF. Molecular Biology. 2nd ed. Boston: McGraw Hill; 2002.
134. França LT, Carrilho E, Kist TB. A review of DNA sequencing techniques. Q Rev Biophys. 2002;35(2):169-200.
135. Brajušković G. Genomika. Vojnosanit Pregl. 2006; 63(6): 604–10.
136. WHO. Diarrhoeal disease. Fact sheet [Internet]. 2013 April [cited 2014 Jan 29]; Available from: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>
137. UNICEF/WHO. Diarrhea: Why children are still dying and what can be done. UNICEF/WHO; 2009.
138. UNICEF. Akutni dijarealni sindrom. U: Priručnik za zdravstvene radnike i roditelje. UNICEF; 2008. Available from: [https://www.unicef.org/serbia/Zivotne3\(1\).pdf](https://www.unicef.org/serbia/Zivotne3(1).pdf)
139. Casburn-Jones AC, Farthing MJG. Management of infectious diarrhoea. Gut 2004; 53(2):296-305.
140. Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, et al. The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of Diarrheal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries: Epidemiologic and Clinical Methods of the Case/Control Study. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. 2012; 55(Suppl 4):S232-S245.
141. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39(2):498-505.
142. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J Virol Methods. 2002;100(1-2):107-14.
143. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
144. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23(21):2947-8.
145. Lewis K. Vesikari Clinical Severity Scoring System Manual. PATH; 2011.

146. Platts-Mills JA, Liu J, Houpt ER. New concepts in diagnostics for infectious diarrhea. *Mucosal Immunology* 2013; 6:876–85.
147. Podkolzin AT, Fenske EB, Abramycheva NY, Shipulin GA, Sagalova OI, Mazepa VN et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007. *J Infect Dis.* 2009;200 Suppl 1:S228-33.
148. Junquera CG, de Baranda CS, Mialdea OG, Serrano EB, Sánchez-Fauquier A. Prevalence and clinical characteristics of norovirus gastroenteritis among hospitalized children in Spain. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(7):604-7.
149. Zuccotti G, Meneghin F, Dilillo D, Romanò L, Bottone R, Mantegazza C et al. Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Northern Italy. *BMC Infect Dis.* 2010;10:218.
150. Bresee JS, Marcus R, Venezia RA, Keene WE, Morse D, Thanassi M et al., the US Acute Gastroenteritis Etiology (AGE) Study Team. The Etiology of Severe Acute Gastroenteritis Among Adults Visiting Emergency Departments in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* 2012; 205(9):1374–81.
151. Liu L-J, Liu W, Liu Y-X et al. Identification of Norovirus as the Top Enteric Viruses Detected in Adult Cases with Acute Gastroenteritis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2010;82(4):717-722.
152. Jansen A, Stark K, Kunkel J et al. Aetiology of community-acquired, acute gastroenteritis in hospitalised adults: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases.* 2008;8:143.
153. Lindell AT, Grillner L, Svensson L, Wirgart BZ. Molecular Epidemiology of Norovirus Infections in Stockholm, Sweden, during the Years 2000 to 2003: Association of the GGIIb Genetic Cluster with Infection in Children. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005;43(3):1086-92.
154. Levidiotou S, Gartzonika C, Papaventsis D, Christaki C, Priavali E, Zotos N et al.. Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(6):596-8.
155. Pativada M, Nataraju SM, Ganesh B, Rajendran K, Ramamurthy T, Ganguly S et al.. Emerging trends in the epidemiology of human astrovirus infection among infants, children and adults hospitalized with acute watery diarrhea in Kolkata, India. *Infect Genet Evol.* 2012;12(8):1685-93.
156. Colomba C, De Grazia S, Giammanco GM, Saporito L, Scarlata F et al. Viral gastroenteritis in children hospitalised in Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(9):570-5.

157. Bányai K, Kisfali P, Bogdan A, Martella V, Melegh B et al. Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003–2006. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 2009;28(8):997-9.
158. La Rosa G, Della Libera S, Petricca S et al. Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013–2015. *BioMed Research International*. 2015;2015:142912.
159. Nasab SD, Sabahi F, Makvandi M, Samiee SM, Nadji SA, Ravanshad M. Epidemiology of Rotavirus-Norovirus Co-Infection and Determination of Norovirus Genogrouping among Children with Acute Gastroenteritis in Tehran, Iran. *Iranian biomedical journal*. 2016;20(5):280.
160. Tran A, Talmud D, Lejeune B, Jovenin N, Renois F, Payan C, Leveque N, Andreoletti L. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(5):1943-6.
161. Patić A, Milošević V, Hrnjaković Cvjetković I, Petrović V, Šeguljev Z, Stefan-Mikić S et al. Viral gastrointestinal syndrome in our environment. *Arch Biol Sci* 2014;66(1):29-35.
162. Wiegering V, Kaiser J, Tappe D, Weissbrich B, Morbach H, Girschick HJ. Gastroenteritis in childhood: a retrospective study of 650 hospitalized pediatric patients. *Int J Infect Dis*. 2011;15(6):e401-7.
163. Narkeviciute I, Tamusauskaite I. Peculiarities of norovirus and rotavirus infections in hospitalised young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;46(3):289-92.
164. Wu TC, Liu HH, Chen YJ, Tang RB, Hwang BT, Yuan HC. Comparison of clinical features of childhood norovirus and rotavirus gastroenteritis in Taiwan. *J Chin Med Assoc*. 2008;71(11):566-70.
165. Lesanu G, Becheanu CA, Vlad RM, Pacurar D, Tincu IF, Smadeanu RE. Clinical characteristics of rotavirus diarrhea in hospitalized Romanian infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(1):89-91.
166. Román E, Wilhelmi I, Colomina J, Villar J, Cilleruelo ML, Nebreda V et al. Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. *J Med Microbiol*. 2003;52(Pt 5):435-40.
167. Valentini D, Vittucci AC, Grandin A, Tozzi AE, Russo C, Onori M et al. Coinfection in acute gastroenteritis predicts a more severe clinical course in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(7):909-15.

168. Ogilvie I, Khoury H, El Khoury AC, Goetghebeur MM. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: Serotype distribution and burden of illness. *Human Vaccines*. 2011;7(5):523-33.
169. Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. *Infect Genet Evol*. 2007;7(2):279-84.
170. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Stallings EP et al. Adenoviruses and pediatric gastroenteritis. *J Infect Dis*. 1985 Mar;151(3):437-43.
171. Li L, Shimizu H, Doan LTP, et al. Characterizations of Adenovirus Type 41 Isolates from Children with Acute Gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(9):4032-9.
172. La Rosa G, Della Libera S, Petricca S, Iaconelli M, Donia D, Saccucci P et al. Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013-2015. *Biomed Res Int*. 2015;2015:142912.
173. Filho EP, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MM, Rocha M et al. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 3):313-9.
174. Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H et al. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol*. 2005;49(2):121-8.
175. Lazić G. Prisustvo i raširenost virusa životinja i ljudi u površinskim vodama Vojvodine [Doktorska disertacija]. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet; 2016.
176. Fong TT, Phanikumar MS, Xagorarakis I, Rose JB. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(3):715-723.
177. Sedmak G, Bina D, MacDonald J. Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(12):7181-7.
178. Portes SAR, Carvalho-Costa FA, Rocha MS, Fumian TM, Maranhão AG, de Assis RM et al. Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183196.

179. Dey RS, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Panchalingam S, Nataro JP, Sur D et al. Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):500-5.
180. Brown M. Laboratory identification of adenoviruses associated with gastroenteritis in Canada from 1983 to 1986. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28(7):1525-9.
181. Lorenzo-Morales J, Coronado-Alvarez N, Martínez-Carretero E, Maciver SK, Valladares B. Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(4):753-6.
182. Chen M, Zhu Z, Huang F, Liu D, Zhang T, Ying D et al. Adenoviruses associated with acute respiratory diseases reported in Beijing from 2011 to 2013. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121375.
183. Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC et al. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology.* 1994;107(5):1398-407.
184. Pager CT, Steele AD. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clin Infect Dis.* 2002;35(11):1452-3.
185. Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Logan L et al. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis.* 1998;178(2):334-9.
186. Fusco G, Di Bartolo I, Cioffi B, Ianiro G, Palermo P, Monini M et al. Prevalence of Foodborne Viruses in Mussels in Southern Italy. *Food Environ Virol.* 2017;9(2):187-194.
187. Lizasoain A, Tort LF, García M, Gómez MM, Cristina J, Leite JP et al. Environmental Assessment of Classical Human Astrovirus in Uruguay. *Food Environ Virol.* 2015 Feb 14. [Epub ahead of print]
188. Zhou N, Lin X, Wang S, Wang H, Li W, Tao Z et al. Environmental surveillance for human astrovirus in Shandong Province, China in 2013. *Sci Rep.* 2014;4:7539.
189. Malasao R, Khamrin P, Chaimongkol N, Ushijima H, Maneekarn N et al. Diversity of human astrovirus genotypes circulating in children with acute gastroenteritis in Thailand during 2000-2011. *J Med Virol.* 2012;84(11):1751-6.
190. Pankovics P, Boros Á, Rovács M, Nagy E, Krisztián E, Volland M et al. First detection of human astrovirus in gastroenteritis outbreak in Hungary. *Orv Hetil.* 2011;152(2):45-50.
191. Soares CC, Maciel de Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez ML, Benati FJ. Astrovirus detection in sporadic cases of diarrhea among hospitalized and non-hospitalized children in Rio De Janeiro, Brazil, from 1998 to 2004. *J Med Virol.* 2008;80(1):113-7.

192. Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N et al. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):133-9.
193. Ulloa JC, Matiz A, Lareo L, Gutierrez MF. Molecular analysis of a 348 base-pair segment of open reading frame 2 of human astrovirus. A characterization of Colombian isolates. *In Silico Biol.* 2005;5(5-6):537-46.
194. Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1058-62.
195. Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM et al. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One.* 2012;7(3):e33754.
196. Cortez V, Freiden P, Gu Z, Adderson E, Hayden R, Schultz-Cherry S. Persistent Infections with Diverse Co-Circulating Astroviruses in Pediatric Oncology Patients, Memphis, Tennessee, USA. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(2):288-290.
197. Zaraket H, Abou-El-Hassan H, Kreidieh K, Soudani N, Ali Z, Hammadi M et al. Characterization of astrovirus-associated gastroenteritis in hospitalized children under five years of age. *Infect Genet Evol.* 2017;53:94-99.
198. Afrad MH, Karmakar PC, Das SK, Matthijssens J, Ahmed F, Nahar S et al. Epidemiology and genetic diversity of human astrovirus infection among hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh from 2010 to 2012. *J Clin Virol.* 2013;58(4):612-8.
199. Gabbay YB, Linhares AC, Cavalcante-Pepino EL, Nakamura LS, Oliveira DS, da Silva LD et al. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belem, Brazil. *J. Med. Virol.* 2007;79:530-8.
200. Palombo EA, Bishop RF. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1750-3.
201. Malasao R, Khamrin P, Chaimongkol N, Ushijima H, Maneekarn N. Diversity of human astrovirus genotypes circulating in children with acute gastroenteritis in Thailand during 2000-2011. *J Med Virol.* 2012;84(11):1751-6.
202. Tran A, Talmud D, Lejeune B, Jovenin N, Renois F, Payan C et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1943-6.

203. Bhattacharya R, Sahoo GC, Nayak MK, Ghosh S, Dutta P, Bhattacharya MK et al. Molecular epidemiology of human astrovirus infections in Kolkata, India. *Infect Genet Evol.* 2006; 6(6):425-35.
204. Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med.* 1991;324(25):1757-60.
205. Sakamoto T, Negishi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S et al. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol.* 2000;61(3):326-31.
206. Wu X, Han J, Chen L, Xu D, Shen Y, Zha Y et al. Prevalence and genetic diversity of noroviruses in adults with acute gastroenteritis in Huzhou, China, 2013-2014. *Arch Virol.* 2015;160(7):1705-13.
207. Wollants E, De Coster S, Van Ranst M, Maes P. A decade of norovirus genetic diversity in Belgium. *Infect Genet Evol.* 2015;30:37-44.
208. Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N et al. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant. *J Clin Virol.* 2014;60(2):96-104.
209. Hoffmann D, Mauroy A, Seebach J, Simon V, Wantia N, Protzer U. New norovirus classified as a recombinant GII.g/GII.1 causes an extended foodborne outbreak at a university hospital in Munich. *J Clin Virol.* 2013;58(1):24-30.
210. Hernandez JDM, Silva LDD, Sousa EC Junior, Lucena MSS, Soares LDS, Mascarenhas JDP et al. Analysis of uncommon norovirus recombinants from Manaus, Amazon region, Brazil: GII.P22/GII.5, GII.P7/GII.6 and GII.Pg/GII.1. *Infect Genet Evol.* 2016;39:365-371.
211. Lim KL, Hewitt J, Sitabkhan A, Eden JS, Lun J, Levy A et al. A Multi-Site Study of Norovirus Molecular Epidemiology in Australia and New Zealand, 2013-2014. *PLoS One.* 2016;11(4):e0145254
212. Lysén M, Thorhagen M, Brytting M, Hjertqvist M, Andersson Y, Hedlund KO. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2411-8.
213. Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K et al. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol.* 2012;84(3):517-25.
214. Ao Y, Wang J, Ling H, He Y, Dong X, Wang X et al. Norovirus GII.P16/GII.2-Associated Gastroenteritis, China, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(7):1172-1175.

215. Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eis-Hübinger AM, Hofmann J, Zimmermann O et al. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro Surveill.* 2017;22(4). pii: 30447.
216. Bidalot M, Théry L, Kaplon J, De Rougemont A, Ambert-Balay K. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(15). pii: 30508.
217. Zhirakovskaia EV, Tikunov AY, Bodnev SA, Klemesheva VV, Netesov SV, Tikunova NV. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003-2012. *J Med Virol.* 2015;87(5):740-53.
218. Hasing ME, Lee BE, Preiksaitis JK, Tellier R, Honish L, Senthilselvan A et al. Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2204-11.
219. Mladenova Z, Korsun N, Geonova T, Di Bartolo I, Fiore L, Ruggeri FM et al. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreak and sporadic cases of acute gastroenteritis in Bulgaria. *J Med Virol.* 2008;80(12):2161-8.
220. Reuter G, Pankovics P, Szucs G. Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic seasons in Hungary. *J Clin Virol.* 2008;42(2):135-40.
221. Andrade JSR, Fumian TM, Leite JPG, Assis MR, Bello G, Mir D et al. Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015. *Infect Genet Evol.* 2017;51:28-32.
222. Chan MC, Lee N, Hung TN, Kwok K, Cheung K, Tin EK et al. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat Commun.* 2015;6:10061.
223. Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD, Vinjé J. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr Opin Virol.* 2012;2(1):96-102.
224. Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS et al. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect.* 2012;140(7):1161-72.
225. Seitz SR, Leon JS, Schwab KJ, Lyon GM, Dowd M, McDaniels M et al. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Oct; *Appl Environ Microbiol.* 2011 Oct;77(19):6884-8.
226. Medici MC1, Tummolo F, Calderaro A, Chironna M, Giammanco GM, De Grazia S et al. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(35):30010.

227. Dinu S, Nagy M, Negru DG, Popovici ED, Zota L, Oprişan G. Molecular identification of emergent GII.P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015. *Euro Surveill.* 2016;21(7):pii=30141.
228. LeBlanc JJ, Pettipas J, Gaston D, Taylor R, Hatchette TF, Booth TF et al. Outbreak of Norovirus GII.P17-GII.17 in the Canadian Province of Nova Scotia. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2016;2016:1280247.
229. Kroneman A, Vega E, Vennema H, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of virology.* 2013;158(10):2059-2068.
230. Durmaz R, Bakkaloglu Z, Unaldi O, Karagoz A, Korukluoglu G, Kalaycioglu AT et al. Prevalence and diversity of rotavirus A genotypes circulating in Turkey during a 2-year sentinel surveillance period, 2014-2016. *J Med Virol.* 2017 Sep 11. doi: 10.1002/jmv.24945. [Epub ahead of print]
231. Tamim S, Hasan F, Matthijnsens J, Sharif S, Shaukat S, Alam MM et al. Epidemiology and phylogenetic analysis of VP7 and VP4 genes of rotaviruses circulating in Rawalpindi, Pakistan during 2010. *Infect Genet Evol.* 2013;14:161-8.
232. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H et al. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol.* 2014;28:426-33.
233. Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K et al. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141739.
234. Ribas Mde L1, Nagashima S, Calzado A, Acosta G, Tejero Y, Cordero Y et al. Emergence of G9 as a predominant genotype of human rotaviruses in Cuba. *J Med Virol.* 2011;83(4):738-44.
235. Min BS, Noh YJ, Shin JH, Baek SY, Kim JO, Min K et al. Surveillance study (2000 to 2001) of G- and P-type human rotaviruses circulating in South Korea. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4297-9.
236. Dóro R, Mihalov-Kovács E, Marton S, László B, Deák J, Jakab F et al. Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. *Infect Genet Evol.* 2014;28:495-512.
237. Ruggeri FM, Bonomo P, Ianiro G, Battistone A, Delogu R, Germinario C et al. Rotavirus genotypes in sewage treatment plants and in children hospitalized with acute diarrhea in Italy in 2010 and 2011. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(1):241-9.

238. Iijima Y, Iwamoto T, Nukuzuma S, Ohishi H, Hayashi K, Kobayashi N. An outbreak of rotavirus infection among adults in an institution for rehabilitation: long-term residence in a closed community as a risk factor for rotavirus illness. *Scand J Infect Dis.* 2006;38(6-7):490-6.
239. Zhirakovskaia EV, Aksanova RKh, Gorbunova MG, Tikunov Alu, Kuril'shchikov AM, Sokolov SN et al. Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in Western Siberia in 2007-2011. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2012;(4):33-41.
240. Zeller M, Patton JT, Heylen E, De Coster S, Ciarlet M, Van Ranst M et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):966-76.
241. Trinh QD, Pham NT, Nguyen TA, Phan TG, Yan H, Hoang le P et al. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotaviruses G2 and G4 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam during 2001-2003. *J Med Virol.* 2010;82(5):878-85.
242. Arana A, Montes M, Jere KC, Alkorta M, Iturriza-Gómara M, Cilla G. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect Genet Evol.* 2016;44:137-44.
243. Dóró R, Marton S, Bartókné AH, Lengyel G, Agócs Z, Jakab F et al. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2016;63(2):243-55.
244. Malasao R, Saito M, Suzuki A, Imagawa T, Nukiwa-Soma N, Tohma K et al. Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human-equine rotavirus reassortment event. *Virus Genes.* 2015;50(1):129-33.
245. Pietsch C, Liebert UG. Molecular characterization of different equine-like G3 rotavirus strains from Germany. *Infect Genet Evol.* 2017;57:46-50.
246. Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J Gen Virol.* 2016;97(2):403-10.
247. Yamamoto SP, Kaida A, Ono A, Kubo H, Iritani N. Detection and characterization of a human G9P[4] rotavirus strain in Japan. *J Med Virol.* 2015;87(8):1311-8.
248. Wang Y, Zhang J, Liu P. Clinical and molecular epidemiologic trends reveal the important role of rotavirus in adult infectious gastroenteritis, in Shanghai, China. *Infect Genet Evol.* 2017;47:143-154.

249. Medici MC, Tummolo F, Guerra P, Arcangeletti MC, Chezzi C, De Conto F et al. Evidence of VP7 and VP4 intra-lineage diversification in G4P[8] Italian human rotaviruses. *Virus Genes*. 2014;48(2):361-5.
250. Steyer A, Sagadin M, Kolenc M, Poljšak-Prijatelj M. Molecular characterization of rotavirus strains from pre- and post-vaccination periods in a country with low vaccination coverage: the case of Slovenia. *Infect Genet Evol*. 2014;28:413-25.
251. Pietsch C, Liebert UG. Human infection with G12 rotaviruses, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1512-5.
252. Maiklang O, Vutithanachot V, Vutithanachot C, Hacharoen P, Chieochansin T, Poovorawan Y. Prevalence of group A genotype human rotavirus among children with diarrhea in Thailand, 2009-2011. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2012;43(4):904-16.
253. Gómez MM, Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, Rose TL, da Silva MF, Fialho A et al. A decade of G3P[8] and G9P[8] rotaviruses in Brazil: epidemiology and evolutionary analyses. *Infect Genet Evol*. 2014;28:389-97.
254. McDonald SM, McKell AO, Rippinger CM, McAllen JK, Akopov A, Kirkness EF. Diversity and relationships of cocirculating modern human rotaviruses revealed using large-scale comparative genomics. *J Virol*. 2012;86(17):9148-62.
255. Wang YH, Pang BB, Ghosh S, Zhou X, Shintani T, Urushibara N. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS One*. 2014;9(3):e88850.
256. Gómez MM, Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, Rose TL, da Silva MF, Fialho AM et al. Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A rotavirus strains during monovalent vaccine introduction in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2014;28:486-94.
257. Zhou N, Lv D, Wang S, Lin X, Bi Z, Wang H et al. Continuous detection and genetic diversity of human rotavirus A in sewage in eastern China, 2013-2014. *Virol J*. 2016;13(1):153.
258. Mukherjee A, Mullick S, Deb AK, Panda S, Chawla-Sarkar M. First report of human rotavirus G8P[4] gastroenteritis in India: evidence of ruminants-to-human zoonotic transmission. *J Med Virol*. 2013;85(3):537-45.
259. Ianiro G, Delogu R, Bonomo P, Fiore L, Ruggeri FM; RotaNet-Italy Study Group. Molecular analysis of group A rotaviruses detected in adults and adolescents with severe acute gastroenteritis in Italy in 2012. *J Med Virol*. 2014;86(6):1073-82.
260. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. 2005;192 Suppl 1:S146-59.

261. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect.* 2011;139(6):895-909.
262. Todd S, Page NA, Duncan Steele A, Peenze I, Cunliffe NA. Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. *J Infect Dis.* 2010 Sep 1;202 Suppl:S34-42.
263. Kang G, Desai R, Arora R, Chitamabar S, Naik TN, Krishnan T et al. Diversity of circulating rotavirus strains in children hospitalized with diarrhea in India, 2005-2009. *Vaccine.* 2013;31(27):2879-83.
264. Luchs A, Timenetsky Mdo C. G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 3):627-41.
265. Tcheremenskaia O, Marucci G, De Petris S, Ruggeri FM, Dovecar D, Sternak SL et al. Molecular epidemiology of rotavirus in central and southeastern Europe. *J Clin Microbiol.* 2007;45(7):2197-204.
266. Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S43-8.
267. Diwakarla S, Clark R, Palombo EA. Expanding distribution of human serotype G6 rotaviruses in Australia. *Microbiol Immunol.* 2002;46(7):499-502.
268. Santos N, Lima RC, Pereira CF, Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2727-9.
269. Bányai K, Gentsch JR, Griffin DD, Holmes JL, Glass RI, Szücs G. Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. *J Med Virol.* 2003;71(1):124-34.
270. Ramani S, Banerjee I, Gladstone BP, Sarkar R, Selvapandian D, Le Fevre AM. Geographic information systems and genotyping in identification of rotavirus G12 infections in residents of an urban slum with subsequent detection in hospitalized children: emergence of G12 genotype in South India. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):432-7.
271. Matthijnsens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153(8):1621-9.
272. Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med.* 2012;13(68):85-97.

Prilog 1

INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE VOJVODINE

Novi Sad, Futoška 121

UPITNIK ZA LABORATORIJSKO ISPITIVANJE VIRUSNIH GASTROENTERITISA	
Zdravstvena ustanova:	
Ime i prezime lekara:	
Kontakt telefon:	
Broj protokola:	
Podaci o pacijentu	
Ime i prezime:	
Datum rođenja:	Pol: M <input type="checkbox"/> Ž <input type="checkbox"/>
Mesto i adresa stalnog boravka:	
Kontakt telefon:	Zanimanje:
Radna organizacija:	
Kolektiv: <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> DA (upisati koji):	
Podaci o bolesti:	
Datum javljanja tegoba:	
Bolest počela: naglo <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> postepeno <input type="checkbox"/>	
Prisutni simptomi i znaci: proliv (broj stolica u 24 ^h ____), u stolici primese krvi i sluzi, povraćanje, povišena telesna temperatura (kolika ____), glavobolja, mučnina, abdominalni grčevi, bolovi u stomaku, bolovi u mišićima, preznjavanje, malaksalost, jeza, drhtavica, kolaps	
Dužina trajanja bolesti _____	
Ostalo/drugo _____	
Slična oboljenja u: porodici <input type="checkbox"/> kolektivu <input type="checkbox"/> naselju <input type="checkbox"/>	
Datum uzimanja bolesničkog materijala:	
Vrsta bolesničkog materijala: feces	
Klinička dijagnoza:	
Klinička definicija slučaja norovirusne infekcije:	
Svaka osoba iz populacije pod rizikom (vrtić, škola, hotel, bolnica, socijalna ustanova) sa sledećim kliničkim simptomima:	
❖ Tri ili više retkih stolica u toku 24 ^h (najčešće je kratkotrajan i slabijeg intenziteta nego kod gastroenteritisa druge etiologije) i/ ili	
❖ Dve ili više epizoda povraćanja u toku 24 ^h (može da bude iznenadno i profuzno, što rezultuje kontaminacijom okoline)	
Klinička definicija slučaja rotavirusne infekcije:	
Svaka osoba iz populacije pod povećanim rizikom (deca do 5 godina) sa sledećim kliničkim simptomima:	
❖ Dijareja	
❖ Mučnina, bol u trbuhu, povraćanje, grčevi	
Klinička definicija slučaja astrovirusne infekcije:	
Svaka osoba iz populacije sa sledećim kliničkim simptomima:	
❖ Dijareja	
❖ Povraćanje, bol u trbuhu, povišena temperatura	

Lekar: _____

Datum: _____

ИНФОРМАЦИЈА ЗА ИСПИТАНИКА

Поштовани,

Позивамо Вас да узмете учешће у испитивању инфекција изазваних вирусима узрочницима акутних гастроентерита код деце, које спроводи Центар за вирусологију Института за јавно здравље Војводине.

Ово испитивање и добијени подаци биће коришћени само у научне сврхе, лични подаци неће нигде бити објављивани, дискреција је загарантована. Тестирање је бесплатно за испитанике. За узимање ушешћа у испитивању не добија се материјална надокнада.

Истраживање је добровољно. Ви одлучујете да ли да узмете учешће у истраживању или не без икаквих последица. Уколико се одлучите да дате податке и сагласни сте да се столица Вашег детета тестира на вирусе узрочнике акутних гастроентерита, молимо Вас да својим потписом потврдите своју сагласност.

За сва додатна питања и информације стојимо Вам на располагању.

Ја, сам прочитао/ла информацију о будућем испитивању. Предочено ми је да могу да прекинем испитивање уколико то желим, да ће подаци бити тајни и коришћени само у стручне и научне сврхе. Пристајем на наведена испитивања без материјалне надокнаде.

Испитаник

(потпис)

Prilog 2

Izolat	Sekvenca dela virusnog genoma	Grupa/tip
HAAdV uzorak 1-SRB	TGCCGCAGTTGGGCTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCCCCGGGCC TGGTGCAGTTGCCCCGCGCCACCGATACCTACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAACCCAC CGTGGCTCCCACCCACGATGTAACCACAGACAGGTGCGAGCGACTGACGCTGCGCTTCGTGCC GTCCGACCGGAGGAAACCGCCTACTCTTACAAAGTGCCTTTACGCTGGCCGTGGGCGACAAC CGGGTTTTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGCGTGTCTG	F/40
HAAdV uzorak 2-SRB	TGCCGCAGTTGGGTTACATGCACATCTCGGGCCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCCCCGGGCT GGTGCAGTTTCCCCGCGCCACCGAGACGTACTTCAGCCTGAATAACAAGTTTAGAAACCCACG GTGGCACCTACGCACGACGTAACCACAGACCGGTCCAGCGTTTTGACGCTGCGGTTTACCTCG TGGACCGGAGGATACCGCGTACTCGTACAAAGCGCGTTTACCCTGGCTGTGGGTGACAACC GTGTGCTTGATATGGCTTCCACGTACTTTGACATCCGCGGGCGTGTGAGT	C/2
HAAdV uzorak 3-SRB	TGCCGCAGTTGGTTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTATCTGAGTCCGGGCCT GGTGCAGTTTCCCCGCGCCACCGATACGTACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAACCCACT GTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTACAGCGACTGACGCTGCGATTTCGTGCCA GTCGACCGGAGGACACCGCTTATTCTTACAAAGTGCCTTTACGCTGGCCGTGGGCGACAACC GGGTGTTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCGCGGGCGTGTGAC	F/41
HAAdV uzorak 4-SRB	TGCCGCAGTTGGGTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTATCTGAGTCCGGGCCT GGTGCAGTTTCCCCGCGCCACCGATACGTACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAACCCACT GTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTACAGCGACTGACGCTGCGATTTCGTGCCA GTCCGACCGGAGGACACCGCTTATTCTTACAAAGTGCCTTTACGCTGGCCGTGGGCGACAACC GGGTGTTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCGCGGGCGTGTGTA	F/41
HAAdV uzorak 5-SRB	GGGGCCGAGTAGTTTACATGCACATCTCGGGCCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCCCCGGG CTGGTGCAGTTTCCCCGCGCCACCGAGACGTACTTCAGCCTGAATAACAAGTTTAGAAACCCCA CGGTGGCACCTACGCACGACGTAACCACAGACCGGTCCAGCGTTTTGACGCTGCGGTTTACCTC TGTGGACCGGAGGATACCGCGTACTCGTACAAAGCGCGTTTACCCTGGCTGTGGGTGACAA CCGTGTGCTTGATATGGCTTCCACGTACTTTGACATCGCGGGCGTGTGAG	C/2
HAstV uzorak 1-SRB	TCAAATTTCCGGGAACAGGTGTCACAGGACCAAAACCTGCAATTTGTCAGAGAGCAACAGAAC CCTTGGGACAGTCGGGTCAAACACAGTGGCACCCTGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTCAAC CCTGTCTCGTTAAGGACGCTACTGGAAGCACTCAGTTTGGCCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCAC AATACTCCATGTGGAAGTTAAAGTATCTGAATGTCAAATTGACCTCTATGGTTGGTGCATCTGC CGTTAATGGTACTGTTCTCAGGGTTTCACTTAACCCACATCTACACCATCTTCCACTAGTTGGT CAGGATTAGCGCACGTAACATCTTGATGTTACGGTTGGTAAGAATGCAACATTTAAATTGAA GCCTTCTGACCTTGGTGGACCTAGGGATGGATGGTGGCTTACTAACACCAATGAATGGGCCAC CTTAAA	klasični/1
HAstV uzorak 2-SRB	TCAACTCCAGGGAACAGGGTGTACAGGACCAAAACCTGCAATTTGCCAAAACAGCCACCGCAA CACTTGGAAACAATTGGATCAAATACCACAGGAGCAACAGAAATTGAGGCGTGCATCTCCTTA ATCCAGTTTTGGTTAAGGACGCTACTGGGAGTACTCAGTTTGGCCAGTGCAGGCGCTAGGAGC GCAGTATTCAATGTGGAAGCTTAAATACCTCAATGTTAGACTAACATCTATGGTGGGTGCCTCA GCAGTCAATGGCACCGTAGTGAGGATATCACTTAACCCGACTTCCACTCCTTCTACTAGTT GGTCTGGGCTTGGAGCGCGCAACACTAGATGTTACTGTTGGCAAAAATGCAGTTTTTAAGTT AAAGCCTTCTGGCTTGGTGGGGCCCTCGGAAGATGGGTTTGGGTGGGTTTTAACAAACCCAC CCCAATGACATTTGTGCCCATTCCTTGGAAAG	klasični/4
HAstV uzorak 3-SRB	TCAACTCCCGGGGAACAGGGTGTACAGGACCAAAACAGCAATATGTCAACGAGCAACAGCA ACGCTCGGAACCGTCCGATCCAATACAAGTGGAAACAACCGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTC AATCCGGTACTTGTAAAGGATGCTACAGGGAGTACTCAATTTGGACCAGTGCAGGCGTAGGG GCGCAGTATTCAATGTGGAAGCTTAAATATCTTAATGTAAAGCTTACTTCCATGGTTGGATCCTC TGCAGTCAATGGTACTGTAGTGAGAGTATCTTGAATCCAACGCTTACACTTCTTCCACTAGCT GGTCTGGCTTGGGAGCTCGAAAAATCTTGACGTGACAGTTGGTAAGAATGCTGTGTTCAAGTT GAAACCAGCTGACCTGGGTGGCCCTAGAGATGGTGGTGGTTAACAAACACCAATGCATGGCC CTTCTGAATG	klasični/5
HAstV uzorak 4-SRB	TCAACTCCCGGGGAACAGGGTGTACAGGACCAAAACAGCAATATGTCAACGAGCAACAGC AACGCTCGGAACCTGTCGGATCCAATACAAGTGGAAACAACCGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTC AATCCGGTACTTGTAAAGGATGCTACAGGGAGTACTCAATTTGGACCAGTGCAGGCGTAGGG GCGCAGTATTCAATGTGGAAGCTTAAATATCTTAATGTAAAGCTTACTTCCATGGTTGGATCCTC TGCAGTCAATGGTACTGTAGTGAGAGTATCTGGGAAATTCCCCCTTCCCTTGGGCCCCAAGG GTTTCCA	klasični/5
HAstV uzorak 5-SRB	TCCACTCCCGGGGAACGGGTTACAGGACCAAAACCTGCAATTTGTCAGAGAGCAACAGCAAC CCTTGGGACAGTCGGGTCAAACACAGTGGCACCCTGAGATTGAGGCGTGTATTCTCCTCAAC CCTGTCTCGTTAAGGACGCTACTGGAAGCACTCAGTTTGGCCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCAC AGTACTCAATGTGGAAGTTAAAGTATTTGAATGTCAAACCTCTATGGTTGGTGCATCTGG CGCAGTATTCAATGTGGAAGCTTAAATATCTTAATGTAAAGCTTACTTCCATGGTTGGATCCTC CGTTAATGGTACTGTTCTCAGGGTTTCACTTAACCCACATCTACGCCATCTTCCACTAGTTGGT CAGGATTAGCGCACGTAACATCTTGATGTTACGGTTGGTAAGAATGCAACATTTAAATTGAA GCCTTCTGACCTTGGTGGACCTAGGGATGGATGGTGGCTTACTAACACCAATGCTTGGGGCCTC TATA	klasični/1

NoV uzorak 1-SRB	TCTGCCGAAATTGTAATGATGATGGCGTCTAAGGACGCCTCTCAAAGCGCTGATGGCGCAA GCGGCGCAGGTCAACTGGTGGCCGAGGTTAATACAGCTGACCCCTTACCCATGGAACCTGTGG CTGGGCCAACACAGCCGTAGCCAGTGTGGCAAGTTAATATGATTGATCCCTGGATTGTTAA TAATTTGTCCAGTCACTCAAGGTAGTTCACAATCTCTCCTAACATAACCCCGGTGATATTT TGTTTGATTTACAATTAGGTCCACATCTAAACCCTTCTTGTCACATTTGTCCCAATGTACAAT GGCTGGGTGG	GI/2
NoV uzorak 2-SRB	CGCAATCTTGCTCCAGTCTTGTAATGAAGATGGCGTGAATGACGCCGCTCCATCTACTGAT GGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAAGTAACAATGAGGTCATGGCTCTTGAACCCGTGGCTGGT GCCGCTTGGCAGCCCCAGTACCCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGGATTAGAGCAAATT TTGTCCAGGCCCCCAATGGTGAATTTACAGTTTCTCCCCGTAATGCCCTGGTGAAGTGTATTG AATCTAGAGTTGGGTCCAGAATTAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGAATGTACAACGGGC AGGATCTGG	GII/2
NoV uzorak 3-SRB	TCGCGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGCGTAGAATGACGC CGCTCCATCTAATGATGGTGTCTGGTCTCGTACCAGAGGGCAACAACGAGACCCTTCCCCTA GAACAGTTGCGGGCGCAGCTATAGCCGCACCCGTCCTGGCCAAAATAACATAATTGACCCC TGGATTAGAACAATTTTGTGCAAGCACAAATGGAGAGTTTACAGTGTACCCAGAAACTCTC CTGGAGAAATTTTAACTTAGAGTTGGGCCCTGATTTGAACCCCTTATTGGCTCATTGTCA AGGATGTACAACGGAAGTGGCCGGCGGA	GII/17
NoV uzorak 4-SRB	TCTTCTGGGAGCGTCTGCGCAATCTGGCTCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGCGTGAATGAC GCCGCTCCATCTAATGATGGTGCAGCCGGTCTCGTACCAGAGGTCAACAACGAGACGATGGCA CTTGAGCCGGTGGTGGGGCTTCCATAGCTGCCCTCTAACCGCCAAAATAATGTGATAGACC CCTGGATTAGAATGAATTTGTGCAAGCTCAAAATGGTGAATTTACAGTGTCCCCCGCAATTC CCCAGGTGAAGTGTGTTAAATTTGGAATTAGGCCCTGAATTAATCCATTCTTGGCACATCTTT CAAGAATGTACAACGGCAAAGGCCGGCGGA	GII/1
NoV uzorak 5-SRB	TCGCAATCTGGCTCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGCGTGAATGACGCCGCTCCATCTAATGA TGGTGCAGCCGGTCTCGTACCAGAGGTCAACAACGAGACGATGGCACTTGAACCCGGTGGCTGG GGCTTCTATAGCTGCCCTCTAACCGGCCAAAATAATGTGATAGACCCTGGATTAGAATGAAT TTTGTCCAAGCTCAAATGGGGAGTTTACAGTGTCCCCCGTAATTTCCCAGGTGAAGTGTGT TAAATTTGGAATTAGGCCCTGAATTAATCCATTCTTGGCACACCTTTCAAGAATGTACAACGG ACAAGGCCGGCGGG	GII/1
NoV uzorak 6-SRB	CTCCGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGCGTGAATGACGC CGCTCCATCTAATGATGGTGTCTGGTCTCGTACCAGAGGGCAACAACGAGACCCTTCCCCTA GAACAGTTGCGGGCGCAGCTATAGCCGCACCCGTCCTGGCCAAAATAACATAATTGACCCC TGGATTAGAACAATTTTGTGCAAGCACAAATGGAGAGTTTACAGTGTACCCAGAAACTCTC CTGGAGAAATTTTAACTTAGAGTTGGGCCCTGATTTGAACCCCTTATTGGCTCATTGTCA AGGATGTACAACGAAATGGCCTGGCGGG	GII/17
NoV uzorak 7-SRB	GGGAGGGCGGATCGCAATCTTGCTCCAGTCTTGTAATGAAGATGGCGTGAATGACGCCGC TCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAAGTAACAATGAGGTCATGGCTCTTGAA CCCGTGGCTGGTGGCCCTTGGCAGCCCCAGTACCCGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTGG TTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATGGTGAATTTACAGTCTCTCCCGTAATGCCCTGGT GAAGTGTATTGAATCTAGAGTTGGGTCCAGAATTAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAAGAA TGTACAACGGAAAAGGCCGGCGAC	GII/2
NoV uzorak 8-SRB	CATCGTGGGAGGGCGATAGCAATCTTGCTCCAGTCTTGTAATGAAGATGGCGTGAATGAC GCCGCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAAGTAACAATGAGGTCATGGCTC TTGAACCCGTGGTGGTGGCCCTTGGCAGCCCCAGTACCCGGTCAAACAAATATTATAGACC TTGGATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATGGTGAATTTACAGTCTCTCCCGTAATGCC CTGGTGAAGTGTATTGAATCTAGAGTTGGGTCCAGAATTAATCCTTATCTGGCACATTTAGC AAGAATGTACAACGGAAAAGCTGGTGGC	GII/2
NoV uzorak 9-SRB	CTCGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGCGTGAATGACGC CAACCCATCTGATGGTCCGACGCCAACCTCGTCCAGAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTCTG GAGCCCGTTGTTGGTGGCCCTTGGCAGCCCCAGTACCCGGTCAAACAAATATTATAGACCCT GGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCCTGGTGGAGAGTTTACAGTATCCCCTAGAAACGCTCC AGGTGAAATACTATGGAGCGCGCCCTGGGCCCTGATCTAATCCCTACCTATCCCATTGGCC AGAATGTACAACGGTCAATGCCGGGGTGTGTCGCTATCGTTGTTATCACCTCCCCGATG	GII/4
NoV uzorak 10-SRB	TCGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAATTTGTGAATGAAGATGGCGTGAATGACGCC GCTCCATCTACTGATGGTGCAGCCGGCCTCGTGCCAGAAAGTAACAATGAGGTCATGGCTCTTG AACCCGTGGCTGGTGGCCCTTGGCAGCCCCGTCCTGGTCAAACAAATATTATAGACCCTTG GATTAGAGCAAATTTTGTCCAGGCCCCCAATGGTGAATTTACAGTCTCTCCCGTAATGCCCT GGTGAAGTGTACTGAATCTAGAGTTGGGTCCAGAATTAATCCTTATCTGGCACATTTAGCAA GAATGTACAACGACAATGCCCGGGC	GII/2
RVA VP4 uzorak 1-SRB	TTCCAGTCAATTGGGGTCAATGAGGAAATCAATGATTCACACAGTGAACCAATTTTATAGATGG TCCTTATCAACCTACTACATTTACACCCTACTGATTATTGGATACTTATTAACCTCAAATACAA ATGGAGTAGTATACGAGAGTACAATAATAGTATTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTTGAACC GCACGTGATCCAGTAGATAGACAATAATAGTATTTGGTGAATAAACAATTTAATGTAAGA AATGATTCAGATAAGTGAAGTTTCTAGAAATGTTTAGAGAGACAGTGTCAAAGTGACTTTTA TAATAGACGTACACTAATCTGATACTAACTCGTAGGAATATTAATAATGTTGGGAAGAATA TGGACATTTTATGGTGAACACCCGAGGGCTACTACCGATAGTCAAACTGCAAAATTTGAAC GGTATATCAATTACAATTCATTAGAATTTTATATTATTTCAAGGTCCCAAGAGTCTAAGTGTA TGAATATATTAATAACGGTCTACCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATT TCATCTAGATCTATACAGTATACGAGAGCACAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACTT	A/P[8]

	CATTATGGA	
RVA VP4 uzorak 2-SRB	TATTGGGGTCATGGAGAAATAAATGATTCAACGACAGTGGAAACCAATTTTAGATGGTCCTTACC AACCTACTACATTTACACCACCTACTGATTATTGGATACTTATTACCTCAAATACAAATGGAGT AGTATACGAGAGTACAAATAATAGTGACTTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTTGAACCGCACGC AATCCAGTAGATAGACAATATAATGTATTGGTGAAAATAAACAATTTAATGTAAAGAAATGATT CAGATAAATGGAAGTTTTAGAAATGTTTAGAGGCAGTAGTCAAAATGACTTTTATAATAGACG TACACTAACTTCTGATACTAGACTCGTGGGAATATTAATAATGGTGGAAAGAGTATGGACATTT CATGGTGAACACCGGAGGGCTACCCTGATAGTTCAAACTGCAAATTTGGACGGTATATCA ATTACAATTCATTCAGAATTTTATATTATTCGAAGGTCCCAAGAGTCTAAGTGAATGAATATAT TAACAACGGTCTGCCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCATCTAGA TCTATACAGTATAAGAGAGCACAAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACCTCATTATG	A/P[8]
RVA VP4 uzorak 3-SRB	AATCATGGGGTCATGGAGAAATAAATGATTCAACCACAGTGGAGCCAATTTTAGATGGTCCTTA TCAACCTACTACATTTACACCACCTACTGATTATTGGATACTTATTAACCTCAAATACAAATGGA GTAGTATACGAGAGTACAAATAATAGTGACTTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTTGAACCGCACG TCGATCCAGTAGATAGACAATATAATGTATTGGTGAAAATAAACAATTTAATGTAAAGAAATGA TTCAGATAAATGGAAGTTTCTAGAAATGTTTAGAGGCAGTAGTCAAAGTGACTTTTATAATAGA CGTACACTAACTTCTGATACTAACTCGTAGGAATATTAATAATGGTGGAAAGAATATGGACAT TTCATGGTGAACACCGGAGGGCTACTACCATTAGCTCAAACACTGCAAATTTGAACGGTATATC AATTATAATTCATTCAGAATTTTATATTATTCGAAGGTCCCAAGAGTCTAAGTGAATGAATATA TTAATAACGGTCTACCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCATCTAG ATCTATACAGTATACGAGAGCACAAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACTTCATTATGG AAAA	A/P[8]
RVA VP4 uzorak 4-SRB	ATATGGGGACACGGAGAGATTAATGATTCAACTACAGTGGAAACAGTTTTAGATGGTCCTTATC AACCAACTACATTTACACCACCAATGATTATTGGCTGCTTATTAGTTCAAATACAGATGGAGT AGTCTATGAAAAGTACAAATAATAGTGACTTTTGGACAGCAGTTATCGCTGTTGAACCAATGTC AGTCCAACAAATAGGCAATATGTTTATTGGTGAAAATAAAGCAGTTTAACTGTAAGAAATAGTT CAGATAAATGGAATTTTTCGAAATGTTTAAAGGTAGTAGTCAAGAGTATTTTCCAATAGACG GACTTTAACCTCTGATAATAGACTTGTAGGAATGCTAAAATACGGTGGAAAGAGTATGGACATTT CATGGTGAACACCAAGAGCTACTACAGATAGTTCGAATACTGCGGATTTAAATAATATCTCAA TTATAATTCATTCAGAGTTTTATATTATTCGAAGATCCCAAGAATCTAAATGTAATGAATATATT AATAATGGTTTACCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCATCTAGATC TATTCAATATAGAAGAGCACAAGTTAATGAAGATATTACAATTTCAAAGACTTCATTATGGAAA ATGG	A/P[4]
RVA VP4 uzorak 5-SRB	CATCATTGGGGTCATGGAGAAATAAATGATTCAACCACAGTGGAAACCAATTTTAGATGGTCCTT ATCAACCTACTACATTTACACCACCTACTGATTATTGGATACTTATTAACCTCAAATACAAATGG AGTAGTATACGAGAGTACAAATAATAGTGACTTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTTGAACCGCAC GTCGATCCAGTAGATAGACAATATAATGTATTGGTGAAAATAAACAATTTAATGTAAAGAAATG ATTCAGATAAATGGAAGTTTCTAGAAATGTTTAGAGGCAGTAGTCAAAGTGACTTTTATAATAG ACGTACACTAACTTCTGATACTAACTCGTAGGAATATTAATAATGGTGGAAAGAATATGGACA TTTCATGGTGAACACCGGAGGGCTACTACCATTAGCTCAAACACTGCAAATTTGAACGGTATAT CAATTACAATTCATTCAGAATTTTATATTATTCGAAGGTCCCAAGAGTCTAAGTGAATGAATAT ATTAATAACGGTCTACCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCATCTA GATCTATACAGTATACGAGAGCACAAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACTTCATTATG GAAAATGCGT	A/P[8]
RVA VP4 uzorak 6-SRB	CAATATTGGGGTCATGGAGAAATAAATGATTCAACGACAGTGGAAACCAATTTTAGATGGTCCTT ACCAACCTACTACATTTACACCACCTACTGATTATTGGATACTTATTACCTCAAATACAAATGG AGTAGTATACGAGAGTACAAATAATAGTGACTTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTTGAACCGCAC GTCGATCCAGTAGATAGACAATATAATGTATTGGTGAAAATAAACAATTTAATGTAAAGAAATG ATTCAGATAAATGGAAGTTTTAGAAATGTTTAGAGGCAGTAGTCAAATGACTTTTATAATAG ACGTACACTAACTTCTGATACTAGACTCGTGGGAATATTAATAATGGTGGAAAGAGTATGGACA TTTCATGGTGAACACCGGAGGGCTACCCTGATAGTTCAAACACTGCAAATTTGGACGGTATAT CAATTACAATTCATTCAGAATTTTATATTATTCGAAGGTCCCAAGAGTCTAAGTGAATGAATAT ATTAACAACGGTCTGCCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCATCTA GATCTATACAGTATAAGAGAGCACAAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACTTCATTATG GAAAATGCGT	A/P[8]
RVA VP4 uzorak 7-SRB	CCCTCATGGGGACACGGAGAGATTAATGATTCAACTACAGTGGAAACCAATTTTAGATGGTCCTT ATCAACCACTACTACATTTAAACCACCAATGATTATTGGCTGCTTATAAGTTCAAATACAGATGG AGTAGTCTATGAGAGTACAAATAATAGTGACTTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTCGAACCCACAT GTCAGTCAAACAATAGGCAATATGTTTATTGGTGAGAATAAAGCAGTTTAAATGTAAAGAAATA GTTTCAGATAAATGGAATTTTTCGAAATGTTTAAAGGTAGTAGTCAAGAGTATTTTCTAATAG ACGGACTTTAACCTCTAATAATGGACTTGTAGGAATGCTAAAATATGGTGGAAAGAGTATGGAGT TTCATGGTGAACACCAAGAGTACCCTGATAGTTTCAACTGCGGATTTAAATAATATATC AATCATAATTCATTCAGAGTTTTATATTATTCGAAGATCCCAAGAGTCTAAGTGAATGAATAT ATTAATAATGGTTTACCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCATCTA GCTATTCAATATAGAAGAGCACAAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACTTCATTATGG AAAGAAATGGAATA	A/P[4]
RVA VP4 uzorak 8-SRB	CCCCAATTATGGGGTCATGGAGAAATAAATGATTCAACCACAGTGGAAACCAATTTTAGATGGTC CTTATCAACCTACTACATTTACACCACCTACTGATTATTGGATACTTATTAACCTCAAATACAAAT GGAATAGTATACGAGAGTACAAATAACAGTGACTTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTTGAACCGC ACGTCGATCCGGTAGATAGACAATATAATGTATTGGTGAAAATAAACAATTTAATGTAAAGAA ATGATTAGATAAATGGAAGTTTTAGAAATGTTTAGAGGCAGTGGTCAAATGACTTTTATAA TAGACGTACACTAACTTCTGATACTAGACTCGTAGGAATATTAATAATGGTGGAAAGAATATGG	A/P[8]

	ACATTTTCATGGTGAAACACCGAGGGCTACTACCGATAGCTCAAACACTGCAAATTTAAACGGT ATATCAATTACAATTCATTCAGAATTTATATTATTTCCAAGGTCCAAGAGTCTAAGTGTAAATGA ATACATTAACAACGGTCTACCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCA TTAGATCTATACAGTATACGAGAGCACAAAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACTTCATT ATGGAAAAAATGTGGGAAAAATAT	
RVA VP4 uzorak 9-SRB	TTCCCCCGCATGGGGACACGGAGAGATTAATGATTCAACTACAGTGGAACCAGTTTTAGATGG TCCTTATCAACCAACTACATTTAAACCACCCAATGATTATTGGCTGCTATAAAGTTCAAGTACA GATGGAGTAGTCTATGAGAGTACAAATAATAGTACTTTTGGACAGCAGTTATCGCTGTGCAAC CACATGTCCAGTCAAACAAAATAGGCAATATGTTTTATTTGGTGAGAATAAGCAGTTAAACGTAGA AAATAGTTCAGATAAATGGAAATTTTTCGAAATGTTTAAAGGTAGTAGTCAGAGTGATTTTTCT AATAGACGGACTTTAACCTCTAATAATGGACTTGTAGGAATGCTAAAATATGGTGGAAAGAGTAT GGACGTTTCATGGTGAAACACCAAGAGCTACCACTGATAGTTCGAATACTGCGGATTTAAATAA TATATCAATCATAATTCAGAGTTTTATATTATTTCCAAGGTCCAAGAGTCTAAGTGTAAATG AATATATTAATAATGGTTTACCAGCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTTCATTATCTCTATCA TCCAGGCTATTCAATATAGAAGAGCACAAAGTTAATGAAGATATTACAATTTCAAACACTTCAT TATGGAG	A/P[4]
RVA VP4 uzorak 10- SRB	CCCCAATTATGGGGTCATGGAGAAATAAATGATTCAACGACAGTGAACCAATTTTAGATGGTC CTTACCAACCTACTACATTTACACCCTACTGATTATTGGATACTTATTACCTCAAATACAAAT GGAGTAGTATACGAGAGTACAAATAATAGTACTTTTGGACTGCAGTCATTGCTGTGTAACCGC ACGTCAATCCAGTAGATAGACAAATAATGTATTTGGTGAAAATAAACAATTTAAATGAAGAA ATGATTCAGATAAATGGAAAGTTTTAGAAATGTTTAGAGGCAGTAGTCAAAATGACTTTTTATAA TAGACGTACACTAATCTCTGATACTAGACTCGTGGGAATATTAATAATGGTGGAAAGAGTATGG ACATTTTCATGGTGAAACACCGAGGGCTACCACTGATAGTTCAAACACTGCAAATTTGGACGGTA TATCAATCATAATTCAGAATTTTATATTATTTCCAAGGTCCAAGAGTCTAAGTGTAAATGAA TATATTAACAACGGTCTGCCACCAATTCAAAATACTAGAAATGTAGTACCATTATCATTATCAT CTAGATCTATACAGTATAAGAGAGCACAAAGTTAATGAAGACATTACAATTTCAAAGACTTCATT ATGGAAAGAAATGCCA	A/P[8]
RVA VP7 uzorak 1-SRB	CTCCCTTAATGTATGGTATTGAATATACCACAATCTAACCTTTCTGATATCATTATTTTATTG AATTATATACTAAAATCATAAAGTGAATGATGGACTTCATTATTTATAGATTTCTTTTATAAAT AGTCATTTTGTGACCATTTTAAAGCTCATAAATATGGAATTAATCTACCAATCACTGGTTTCAA TGCATATCCATACCCTAATCTACACAAATGAGAAAATTTTCTTACACTACTCTACTCTTTGTAC TATCTATCAAAACTGCAACAGAAATAAATGACAATTCATGGAAAGATACACTCTCACAATTTGT TTTTCAAAAAGGATGGCCTACTGGATCAGTTACTTTTAAAGAGTATACAGACATCGCTTCTTTT TCAGTCGATCCACAGTTACTGTGATTACAATGTTGTTCTAATGAAATACGATGCTACGCTGC AAGTGGATATGTCTGAATTAGCTGATTGATACTGAATGAATGGTTATGTAATCCAATGGATAT TACTTTATACTATTACCAACAACAGATGAGGCCAATAAGTGGATTTCTATGGGATCATCATGT ACAATTAAGTGTGTCCGCTCAATACGCAAACTTTAGGAATGGTTGTTTACTACTGATGGCA CAACATTCGAAGAAGTTGCTACGGCTGAGAAATAGTCACTACTGATGTTGTTGATGGAGTCAA TCATAAACTAGATGTTACTACGGCTACTTGTACGATCAGAAATGTAATAAACTAGGACCAAGA GAAATGTAGCAGTAATTCAGTTGGAGGTTCTGATGTTCTTGATATAACAGCTGATCCCACTA CAGCACCACAGACTGAAAGAATGATGCGTATTAATGGAAAAAATGGTGGCAGGTATTTTACA CTGTAGTTGACTATGTAATCAATAATCCAAGCAATGTCCAAAAGATCGCGATCGTTAAACTC TGCAGCATT	A/G3
RVA VP7 uzorak 2-SRB	GGTATGGAATATACCACAATCTAATCTTTCTGATATCAATCATTCTATTCAACTATATATAAA ATCAGTGACTCAAATGATGGACTACCTTATATATAGATTTTGTAAATTTCTGTAGCTTTATTTG CTTTGACAAGATTCAGAATTTATGGGATTAACCTTACCAATAACAGGATCAATGGACCGCCGATA CGCTAACTGTACTCAAGAAGGAATTTTCTAACATCCACATTATGTCTATATTATCCGACAGAA GCAAGTACTCAAATTAATGATGGTGAATGGAAAGACTCATTATCACACATGTTTCTCACAAGAG GTTGGCCAACAGGATCAGTCTATTTTAAAGAGTATTCAAGTATTGTTGATTTTCTGTTGATCCA CAATTTATTTGTGATTATAAATTAGTACTAATGAAATATGATCAAAAATCTGAAATAGATATGTC AGAGTTAGCTGATTTAATATTGAATGAATGGTTATGTAATCCAATGGATATAACATTATATTATT ATCAACAATCAGGAGAATCAAACAAGTGGATATCAATGGGATCATCATGTACTGTGAAAGTGT GTCCACTGAATACGCAACGTTAGGAATAGGCTGTCAAAACAACAATGTAGACTCGTTTGAAA GTTGCTGTTGAAAATGAGAAATAGCTATAGTGGACGCTGTTGATGGGATAAATCATAAAAATAA ATTTGACAACACTACGACATGTACTATTCGAAATGTAAGAAGTTAGGTCCAAGAGAGAATGTAGC TGTAATACAGGTTGGTGGCTTAATGTATTAGACATAACAGCAGATCCAACGACTAATCCACAA ACTGACAGAAATTTGCAAAATATCTTTATATAAAGTATTCCATCATTGTAATCACTGATTTAATA TAATGATGAAATGATTGATGTCCAAAAGATCAAAAATTTGTTGATTCTCTACCTTTCATCAAA AGGATCTAACCTTTCCATACGAAATCTCTTTTTTACC	A/G1
RVA VP7 uzorak 3-SRB	GGTTAGCTTCTTTAATGTATGGTAAGATATATACCACAATCTAATCTTTCTGATATCAATCAT TCTACTCAACTATATATTGAAATCAGTGACTCCAATAATGGACTACATTATATATAGATTTTTGT TAATTTCTGTAGCATTATTTGCTTTAACTAAAGCTCAGAATATGGACTTAAACATACCAATAACA GGATCAATGGATACTGTATACTCCAACTCTACTCAACAAGGAATATTTCTAACATCCACATTAT GTTTGTATTATCCAACACTGAAACAAGTACTCAAATCAGAGATGGTGAATGGAAAGACTTTTATC TCAAATGTTCTTACAAAAGTTGACCATCATGATCAGTCTATTTTAAAGAGTATTCAAACATC GTTGATTTTTCCGTTGACCCACAATTATATTGTGATTATAAATAGTACTAATGAAGTATGATCA AAATCTTGAATTAGATATGTCAGAGTTAGCTGATTGATATTGAATGAATGGTTATGTAATCCA ATGGATATAACATTATATTATCAACAATCAGGAGAATCAAATAAGTGGATATCAATGGGAT CATCATGTACTGTGAAATTTATGTCCACTGAATACACAACGTTGGGAATAGGTTGTGTCAAAAC GAATGTAGACTCATTGAAACAGTTGCTGAGAATGAAAAATAGCTATAGTGGATGTCGTCGAT GGGATAAATCATAAAAATAAATTTGACAACACTACGACATGTACTATTCGAAATTTGAAGAAGTTAG GTCCAAGAGAGAATGTAGCTGTAATACAAGTTGGTGGCTTAATATATTAGACATAACAGCGG ATCCAACGACTAATCCACAAAATGAGAGAATGATGAGAGTGAATGGAAAAGATGGTGGCAAG	A/G1

	TATTTTATACCATAGTAGATTACATTAATCAGATTGTACAGGTAATGTCCAAAAGATCAAGATC ATTAGATTCT	
RVA VP7 uzorak 4-SRB	GCTAGCGGTTAGCTCTTTTAAATGTATGGTATTGAATATACCACAATTCTGACCATTTTGATATT TATCATATTGAATTATATATATAAAAACTATAACTAATACGATGGACTATATAATTTTAGGT TATTACTATTATCGCTCTGATGTCACCATTTGTGAGGACGCAAAATTTATGGTATGTATTTACCA ATAACAGGATCACTAGACGCTGTATACACAAATCAACTAGTGGAGAATCATTCTAACTTCAA CGCTATGTTTATACTATCCAACAGAAGCTAAAAATGAGATTTCAGATAATGAATGGGAAAAATAC TCTATCGCAATTTATTTAACTAAAGGATGGCCGACTGGATCAGTTTATTTTAAAGACTACAATG ATATTACTACATTTTCTATGAATCCACAACATATTTGTGATTATAATGTAGTGTGATGAGATAT GATAATACATATGAAGTAGATGCATCGGAGCTAGCAGATCTCATATTGAATGAATGGCTGAGC AATCCTATGGATATATCACTTTATTATTATCAACAAAATAGCGAATCAAATAATGGATATCAA TGGGAACGGACTGTACGGTAAAAGTTAGTCCACTCAATGCACAAACTTTAGGAATAGGATGCA AAACTACGGACGTGGATACATTTGAGATTGTTGCCCTCGTCTGAAAAATTTGGTAACTACTTGACGT TGTAATGGTGTAAATCATAAAAAATAATTTCAATAAGTACGTGACTATACGTAATTGTAAT AACTAGGACCACGAGAAAATGTTGCTATAATTCAGTTGGTGGACCGAACGCACTAGATATC ACTGCTGATCCAACAACAGTTCCACAGGTTCAAAGAATCATGCGAGTAAATTTGGAAAAATGG TGGCAAGTGTTTTACACAGTAATTGACTATATTAACCAAATATACAAGTTATGTCCAAACGGT CAAGATCATTAAAAACG	A/G2
RVA VP7 uzorak 5-SRB	TATACCACAATTCTAACCTTTCTGATATCATTTATTTTATTTGAATTATATACTAAAAATCATTAACT AGAATGATGGACTTCATTATTTATAGATTTCTTTTATAATAGTCATTTTGTCCACCATTATTGAA AGCTCAGAATTATGGAATTAATCTACCAATCACTGGTTCAATGGATACGCTATACGCTAATTCT ACACTAGGAGAACTTTTCTTACATCTACTCTATGTTTGTACTATCCTAGCGAAGCTGCAACAG AAATAAATGACAATTCATGGAAAGATACACTCTACAATTTTAACTAAAGGATGGCCTAC TGGATCAGTTTATTTAAAGAGTATACAGATCGCTTCTTTTTCAGTCGATCCAGTTTACTACT GTGATTACAATGTTGTTCTAATGAAATACGATGCTACGCTGCAACTGGATATGTCTGAATTAGC TGATTTGATACTGAATGAATGGTTATGTAATCCAATGGATATTACTTTATACTATTACCAACAAA CAGATGAGGCCAATAAGTGGATTTCTATGGGATCATCATGTACAATTAAGTGTGTCCGCTCAA TACGCAAACTTTAGGAATTTGTTGTTGACTACTGATGCGACAACATTCGAAGAAGTTGCCACG GCTGAGAAATTAGTCACTACTGATGTTGTTGATGGAGTCAATCATAAACTAGATGTTACTACGG CTACTTGTACGATCAGAAATGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAAAATGTAGCAGTAATTCAG TTGGAGGTTCTGATGTTCTTGATATAACAGTGTATCCACTACAGCACCACAGACTGAAAAGAT TTGGCGTATTAATTTGGAAAAATGGTGGCAGGTATTTTACACTGTAGTTGACTATGTAATCAA ATAATCCAAGTAAATGTCCAAAAGATCGCGATCGTTAAACTCTGCAGCA	A/G3
RVA VP7 uzorak 6-SRB	TTAATTTCTGTAGCTTTATTTGCTTTGACAAGAGCTCAGAATTATGGGATTAACCTACCAATAAC AGGATCAATGGACGCCACATACGCTAACTCTACTCAAGAAGGAATATTCTAACATCCACATTA TGTCTATATTATCCGACAGAAGCAAGTACTCATATTAATGATGGTGAATGGAAAGACTCATTAT CACACATGTTTCTCACAAAAGGTTGGCCAACAGGATCAGTCTATTTTAAAGAGTATTCAAGTAT TGTTGATTTTTCTGTTGATCCACAATTATTTGTTGATTATAACTTAGTACTAATGAAATATGATC AAAATCTGAATTAGATATGTCAGAGTTAGCTGATTTAATATTGAATGAATGGTTATGTAATCC AATGGATATAACATTATATTATTATCAACAATCAGGAGAATCAAACAAGTGGATATCAATGGG ATCATCATGTACTGTGAAAGTGTGTCCACTGAATACGCAACGTTAGGAATAGGCTGTCAAACA ACAAATGTAGACTCGTTTGAATGGTTGCTGAAAAATGAGAAAATTAGCTATAGTGGACGTCGTTG ATGGGATAAATCATAAAAAATAATTTGACAACACTACGACATGACTATTCGAAATTTGAAGAATT AGGTCCAAGAGAGAATGTAGCTGTAATACAGGTTGGTGGCTCTAATGTATTAGACATAACAGC AGATCCAACGACTAATCCACAACTGAGAGAATGATGAGAGTGAATTTGGAAAAA	A/G1
RVA VP7 uzorak 7-SRB	CGTCGTCGCTAGCGGTTAGCTCTTTTAAATGTATGGTATTGAATATACCACAATTCTGACCATTT TGATATTTATCATATTATTGAATTATATATATAAAAACTATAACTAATACGATGGACTATATAATT TTTAGGTTTTTACTACTCATCGCTCTGATGTCACCATTTGTGAGGACGCAAAATTTATGGTATGTA TTTACCAATAACAGGATCACTAGACGCTGTATACACAAATCAACTAGTGGAGAATCATTTTTA ACTTCAACGCTATGTTTATACTATCCAAACAGAAGCTAAAAATGAGATTTTCAGATAATGAAATGGG AAAATACTCTATCGCAATTTATTTTAACTAAAGGATGGCCGACTGGATCAGTTTATTTTAAAGA CTACAATGATATTACTACATTTTCTATGAATCCACAACTATATTGTGATTATAATGTAGATTGA TGAGATATGATAATACATCTGAATTAGATGCATCGGAGTTAGCAGATCTTATATTGAAACGAATG CTGTGCAACTCTATGGATATATCACTTTACTATTATCAACAAAATAGCGAATTTAAATGAAATGG ATATCAATGGGAACGGACTGTACGGTAAAAGTTTGTCCACTCAATACACAAACTTTAGGAATTG GATGTAACCTACGGACGTGGATACATTTGAGATTGTTGCCCTCGTCTGAAAAATTTGGTAATTAC TGATGTTGTAATGGTGTAAATCATAAAAAATAATTTTCAATAAGTACGTGTACTATACGTAAT TGTAATAAATAGGACCACGAGAAAATGTTGCTATAAATTCAGTTGGTGGACCGAACGCACTA GATATCACTGCTGATCCAACAACAGTTCCACAGGTTCAAAGAATCATGCGAGTAAATTTGGAAA AAATGGTGGCAAGTGTTTTATACAGTAGTTGACTATATTAACCAAATTTATACAAGTTATGTCCA AACGGTCAA	A/G2
RVA VP7 uzorak 8-SRB	TTGGCGGGGGCTCCTTCTTAATAAAGGGTGGGGGTTATCACCGCTCCTGTCTGTCTGTAATCA ATAGTTTTATTGAACTACATATTAATAAATACTAATACTAGTGCATGGACTTTATAATTTATAGATT TCTTTTACTTATTGTTATTTTGTCCACTTTGTCAAACACAAAATTTATGGGATAAATTTACCAA TTACTGGCTCCATGGACACAGCATATGCAAAATTCGTCACAGCAAGAAAACATTTCAACTCAAC GCTATGTTTATATTATCCTACTGAAGCATCAACTCAAATTTGGAGATACCGAATGGAAGAATACT CTATCTCAATTAATCTGACTAAGGGGTGGCCAACTGGATCAGTTTATTTTAAAGAATATACAG ATATCGCTTCTGTTCAATTTGATCCACAACCTTTATTGTGATTATTATGTTGTGCTAATGAAGCAT GATTCACGTTAGAGCTAGATATGTTTGAATTTGGCTGATTTGATTCTAAATGAATGGTTATGCA ATCCAATGGATATAACATTATATTATAATCAGCAACAGATGAATCGAATAAATGGATATCGAT GGGACAATGTTGTGCCATAAAAGTGTGCGCATTAAATACACAACTTTAGGAATAGGTTGTAAT ACTACAAATACAGCGACATTTGAAGAAGTAGCTACTAGTGAGAAAATTAGTGATAACTGATGTT GTTGATGGTGTGAATCATAAACTTGATGTAACATAAATACCTGTACAATTAGAAAATTGTAAGA	A/G9

	AGTTAGGACCGAGAGAGAATGTAGCAATTATACAAGTCGGTGGCTCAGAAGTGTTAGATATTA CAGCGGATCCAACCTACCACACCACAACTGAGCGTATGATGCGAGTAAATTGGAAAAAGCGCC GGCAGTATTACTGAGCGATAATAGATGATATTAACAGATCGGGTGATTTTCAGAGAGAAAAAGA GTGGTGATAAATCCCCACCTTATTA AAAAGGAGCCGACG	
RVA VP7 uzorak 9-SRB	TTTAATGTATGGTATTGAATATACCACAATTCTGACCATTTTGATATTTATCATATTATTGAATT ATATATTA AAAACTATAACTAATACGATGGACTATATAATTTT TAGGTTTTTACTACTCATCGCT TTGATGTCACCATTTGTGAGGACGCAAAATTTATGGTATGTATTTACCAATAACAGGATCACTAG ACGCTGTATACACAAATCAACTAGTGGAGAATCATTCTAACTTCAACGTTATGTTTTATACTAT CCAACAGAAGCTAAAAATGAGATTTTCAGATAATGAATGGGAAAAACTCTATCGCAATTATTTT TAACTAAAGGATGGCCGACTGGATCAGTTTATTTTAAAGACTACAATGATATTACTACATTTTCT ATGAATCCACAACCTATATTGTGATTATAATGTAGTATTGATGAGATATGATAATACATCTGAAT TAGATGCATCGGAGTTAGCAGATCTTATATTGAACGAATGGCTGTGCAATCCTATGGATATATC ACTTTACTATTATCAACAAAATAGCGAATCAATAAATGGATATCAATGGGAACGGAATGTAC GGTAAAAGTTTGTCCACTCAATACACAACTTTAGGAATTGGATGTAAAACTACGGACGTGGAT ACATTTGAGATTGTATGCCTCGTATGAAAAATTGGTAATTATTGATGTAGTAAATGGTGTAAATC ATAAAATAAATATTTCAATAAGTACGTGTACTATACGTAATTGTAATAAACTAGGACCACGAGA AAATGTTGCTATAATTCAAGTTGGTGGACCGAACGCACTAGATATCACTGCTGATCCAACAACA GTTCCACAGGTTCAAAGAATCATGCGAGTAAATTGGAAAAAATGGTGGCAAGTGTTTTATACA GTAGTTGACTAT	A/G2
RVA VP7 uzorak 10- SRB	ATTATTGCCTTGACAAGAGCTCAGAATTATGGGATTA ACTTACCAATAACAGGATCAATGGAC GCCGCATACGCTAACTCTACTCAAGAAGGAATATTTCTAACATCCACATTATGTCTGTATTATCC GACAGAAGCAAGTACTCAAATTAATGATGGTGAATGGAAAGACTCATTATCACAAATGTTTCTC ACAAAAGGTTGGCCAACAGGATCAGTCTATTTTAAAGAGTAGTCAAGTATTGTAGATTATTCTG TTGATCCACAATTATATTGTGATTAACTTAGTATTAATGAAATATGATCAAAATCTTGAATTA GATATGTCAGAGTTAGGTGATTTAATATTGAATGAATGGTTATGTAATCCAATGGATATAACAT TATATTATTATCAACAATCAGGAGAATCAAACAAGTGGATATCAATGGGATCATCATGTACTGT GAAAGTGTGCCACAGAATACGCAAAACGTTAGGAATAGGCTGTCAAACAACAAAGGTAGACTC GTTTGAAATGGTTGCTGAAAATGAGAAATTAGCTATAGTGGATGTCGTTGATGGGATAAATCAT AAAATAAATTTGACAACCTACGACATGTACTATTGAAAATTGTAAGAAGTTAGGTCCAAGAGAG AATGTAGCTGTAATACAGGTTGGTGGCTATAATGTATTAGACATAACAGCAGATCCAACGACTA ATCCACAACTGAGAGAATGATGAGAGTGAATTGGAAAAAATGGTGGCAAGTATTTTATACTA TAGTAGATTATTAACCAGATTGTACAGGTAATGTCCAAAAGATCAAGATCATTAAATCTGC AGCTTTTATTATAGAGTATAGATATACCTTAGATTAGAATTGTTTCGATGTGACC	A/G1