Učestalost zaraze rotavirusom u šestomjesečnom periodu na području Osječko-baranjske županije

Vondrak, Tihana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:979923

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Tihana Vondrak

UČESTALOST ZARAZE ROTAVIRUSOM U ŠESTOMJESEČNOM PERIODU NA PODRUČJU OSJEČKO-BARANJSKE ŽUPANIJE

Završni rad

Mentor: Doc. dr. sc. Ljiljana Krstin

Neposredni voditelj: Dr. sc. Arlen Antolović-Požgain

Osijek, 2015. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Učestalost zaraze rotavirusom u šestomjesečnom periodu na
području Osječko-baranjske županije

Tihana Vondrak

Rad je izrađen: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Mentor: Dr. sc. Ljiljana Krstin, doc.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Arlen Antolović- Požgain

Kratak sažetak završnog rada:

Završni rad proučava morfologiju, genomsku strukturu, mehanizam infekcije i učestalost zaraze rotavirusom. Rotavirus je jedan od glavnih uzročnika gastroentritisa u dojenčadi i male djece, a prenosi se oralno-fekalnim putem. Laboratorijska dijagnostika rotavirusa se u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije provode rutinski. Iz podataka dobivenih od Zavoda za javno zdravstvo, uočeno je da se glavnina rotavirusnih infekcija događaju u periodu od 1. siječnja do 30. lipnja.

Broj stranica: 19

Broj slika: 3

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 7

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: rotavirus, zaraza, genomska struktura, serološki test, dvostruka RNA

Datum ocjene: 17.rujna 2015.g

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Department of Biology

BS thesis

Undergraduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

Frequency of rotavirus infection during a six month period in the Osječko-Baranjska county

Tihana Vondrak

Thesis perfomed at: Department of biochemistry and plant ecophysiology

Department of public health of Osječko-Baranjska county

Supervisor: Dr. sc. Ljiljana Krstin, doc.

Assistant: Dr. sc. Arlen Antolović- Požgain

Abstract:

This paper studies the morphology, genomic structure, infection mechanisms and occurence of rotavirus infection. Rotavirus is one of the main causes of gastroentritis in infants and small children, furthermore it is transmitted through oral-fecal contact. Laboratory diagnostic of rotavirus are routinely conducted in the Department for public health of the Osječko-Baranjska county. From the data acquired from the Department for public health, it has been noticed that most rotavirus infections occur in the period from January 1st to June 30th.

Number of pages: 19

Number of figures: 3

Number of tables: 1

Number of references: 7

Original in: Croatian

Key words: rotavirus, infection, genomic structure, serologic test, double-stranded RNA

Date of the thesis defense: 17th of September 2015

Thesis deposited in Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Sadržaj

1. Uvod 4
2. Osnovni dio 5
2.1 Karakteristike rotavirusa 5
2.2. Genomska struktura 6
2.3. Struktura i funkcija rotavirusnih proteina 8
2.4. Replikacija rotavirusa 10
2.5. Odgovor stanice na infekciju- važnost PKR 12
2.6. Laboratorijska dijagnostika 14
2.7. Podatci Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije 15
3. 3. Zaključak 16
4. 4. Literatura: 17

1. Uvod

Rotavirusi su dvolančani RNA virusi (dsRNA) i među najčešćim su uzročnicima akutnog gastroentritisa u ljudi i drugih životinja (Estes i Kapikian, 2007). Unatoč medicinskoj važnosti rotavirusa, postoje praznine u znanju o mehanizmu njihove replikacije u stanici domaćina. Osobito je malo poznat mehanizam sinteze njihovog dsRNA genoma za vrijeme slaganja virionskih čestica (Guglielmi i sur., 2010; Patton i sur, 2007; Trask i sur., 2012). Kombinacija mehanizma genomske replikacije sa sastavljanjem proteinskih ovojnica rezultat je obrane virusa od staničnih mehanizama samoobrane od infekcije. Virusi se unutar zaražene osobe detektiraju serološkim testovima, ali najpouzdanija metoda je elektronska mikroskopija. Uzorak za izolaciju virusa jest ispirak ždrijela i obrisak rektuma. Infekcija rotavirusa se širi oralno-fekalnim putem. Ljudi se inficiraju rotavirusom grupe A, B i C. Virusi grupe A i C primarno uzrokuju infekcije kod djece iako se infekcije tim grupama virusa pojavljuju tijekom cijelog života. Odrasle osobe češće bivaju zaražene grupom B. Zabilježeno je nekoliko velikih epidemija gastroenteritisa uzrokovanih rotavirusima grupe B. Bolest se očitovala teškom slikom proljeva pa je bila nalik na koleru. U starijoj dobnoj skupini zabilježeni su smrtni ishodi. Rotavirusi A najvažniji su uzročnici gastroenteritisa u dojenčadi i u male djece. U većini zemalja svijeta vrh je rotavirusnih infekcija između 4. mjeseca i 3. godine života. Neliječena bolest jedna je od najčešćih uzroka smrti dojenčadi zemalja u razvoju. Ipak, većina tih infekcija protječe asimptomatski ili s blažom slikom proljeva. U odraslih infekcija prolazi asimptomatski ili uz mali porast specifičnih antitijela. Velika većina infekcija pojavljuje se u zimi ili u rano proljeće. Premda se virus širi oralno-fekalnim putem moguća je infekcija i preko dišnog sustava.

2. Osnovni dio

2.1 Karakteristike rotavirusa

Svi rotavirusi dijele određene morfološke i biokemijske značajke. Oni su neobavijeni i posjeduju višeslojnu ikozaedarsku proteinsku kapsidu (vanjska T=13 i unutarnja T=2 kapsida s jezgrom) koja je u prosjeku široka 75 nm. Genom virusa se sastoji od dvostruke RNA uzvojnice podijeljene u 11 segmenata koja kodira 12 proteina. Transkribirana mRNA ima metilensku kapu na 5' kraju, ali nema poly-A-rep na 3' kraju nego konsenzus sekvencu (UGACC), a mRNA su monocistronske. Sve čestice posjeduju RNA ovisnu RNA-polimerazu i sve ostale enzime potrebne za replikaciju virusa. Replikacija virusa se odvija u citoplazmi infektiranih stanica, ali nema kontakta citoplazme s dvostrukom RNA. Kultivacija virusa *in vitro* zahtjeva tretmane polimerazama koje pojačavaju infektivnost cijepajući proteina VP4 koji se nalazi na vanjskoj kapsidi virusa. Na samom kraju replikacije virusne čestice nastaju pupanjem u endoplazmatskom retikulumu, a potom se oslobađaju iz stanice lizom. Iako nema službenog sistema klasifikacije, rotavirusi se dijele na serogrupe koje sadrže viruse koje dijele reagirajuća antigene koji se mogu detektirati metodama poput ELISA, imunofluorescencije i imunoelektronske mikroskopije. Sveukupno je opisano šest grupa: A, B, C, D, E i F. Grupe A, B i C su pronađene u ljudi, a grupe D, E i F samo u životinjama. Virusi unutar serogrupa se dalje klasificiraju u serotipove prema reaktivnosti specifičnih antitijela sa kapsidnim proteinima VP4 i VP7. Zanimljivo je da u najvećem broju slučajeva najjača reakcija antitijela hiperimunog seruma na VP7 protein. To se objašnjava time da je VP7 količinski dominantniji u odnosu na VP4. Rotavirusi grupe A na temelju tipnospecifičnog antigena VP7 svrstani su u 14 serotipova: označeni su od G1 do G14 (G-glikoprotein). Osim toga, rotavirusi grupe A tipnospecifičnim antigenom VP4 podijeljeni su u još 11 serotipova koji su označeni od P1 do P11. Serotipovi P neovisni su o serotipovima G. VP4 proteazom se cijepa u dvije proteinske molekule: jedna s aktivnošću spajanja za stanicu domaćina (NSP1) i druga kao tipnospecifični hemaglutinin (NSP2). Gotovo svi izolirani rotavirusi identificirani su kao serotipovi od G1 do G4 grupe A rotavirusa.

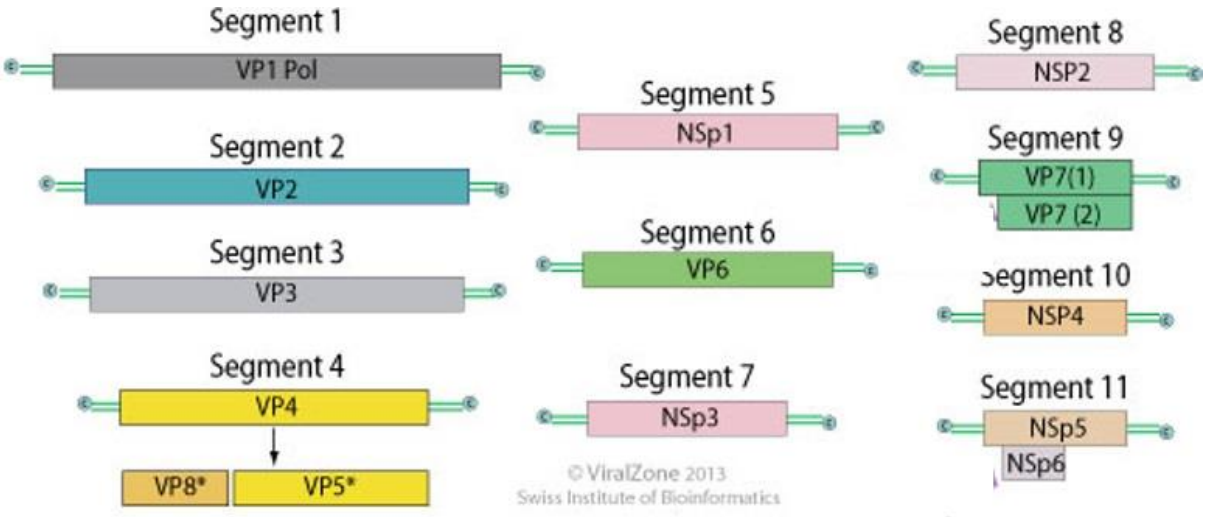
Morfološki rotavirusi oblikom podsjećaju na kotač, *lat. rota*=kotač. Tri tipa virusnih čestica se može promotriti elektronskom mikroskopijom: dvostruko obavijena, jednostruko obavijena i jezgra. Dvostruko obavijena čestica je promjera 75nm, jednostruko obavijena 70,5nm, a jezgra 50nm. Jednostruko obavijene čestice i čestice jezgre se mogu dobiti kemijskom

razgradnjom vanjske i unutrašnje ovojnice. Trenutno nije poznato jesu li te čestice jednake građe sub-virusnim česticama koje se sintetiziraju tijekom virusne replikacije. Prepoznatljiva karakteristika je postojanje 123 transmembranskih proteinskih kanala koje prolaze kroz sve ovojnice i povezuju unutrašnjost virusne čestice s unutarnjom jezgrom. S obzirom na položaj i veličinu kanala razlikujemo tri tipa. Ovi proteinski kanali su izrazito uski u blizini vanjske strane, a približavanjem prema unutarnjoj jezgri se šire. Biološka važnost ovih kanala još uvijek nije ustanovljena, no pretpostavlja se da su potrebni za import metabolita potrebni za RNA sintezu i eksport nascentnih RNA transkripta za replikaciju virusa. Isto tako je uočeno 60 šiljaka koji izlaze iz glatke vanjske kapside, s proširenjem na vrhu. Šiljci su minimalno dugački 4,5 nm, a sastavljeni su od hemaglutininskog (VP4) dimernog kompleksa. Prepoznatljiva i dobro proučena morfologija rotavirusa je dobro vidljiva elektronskom mikroskopijom, upravo iz tog razloga sve nove eksperimentalne tehnike za detekciju virusa se uspoređuju s rezultatima elektronske mikroskopije. Vanjska kapsida se gubi ulaskom u domadarsku stanicu.

2.2. Genomska struktura

Dvostruka RNA uzvojnica se nalazi unutar jezgrene kapside, segmentirane na 11 dijelova, koji variraju od 667pb (11. segement) do 3302pb (1. segment), a ukupni genom sadrži 18 522 pb (Slika 1). Ukupno 6 segmenata kodira strukturne (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7), a 5 nestrukturne proteine (NSP 1-5). Istraživanja o fleksibilnosti RNA genoma virusa ukazuju na to da se ukupna RNA ne može pakirati u jezgrinu ovojnicu ukoliko nema interakcije RNA-protein potrebne za savijanje i pakiranje nukleinske kiseline. Priroda proteina koji se vežu s RNA je još uvijek nepoznata. Najbolji kandidati su VP1, VP2 i VP3 strukturni poteini koji se nalaze vezani za izoliranu jezgrenu česticu virusa. Same izolirane dsRNA nisu infektivne, što je dokaz da virusne čestice sadrže vlastitu RNA ovisnu RNA-polimerazu potrebnu za virusnu transkripciju individualnih RNA segmenata u aktivne messenger RNA (mRNA). Glavni strukturni protein unutarnje kapside je VP6. Protein VP6 određuje grupnu specifičnost rotavirusa. Vanjska kapsida ima 132 kapsomere, a svaka kapsomera ima malu udubinu. Svaki segment RNA na svome 5' kraju započinje gvanidinom. Gvanidin je organski spoj u obliku bezbojnih higroskopnih kristala. Jaka je baza i hidrolitički je produkt nekih aminokiselina i može se pronaći u mokraći. Nakon gvanidina slijedi konzervirana sekvenca koja je dio 5' nekodirajuće sekvence; nakon nje slijedi kodirajuća sekvenca, a potom ponovno nekodirajuća

sekvenca koja najavljuje 3' kraj segmenta. 3' terminalni kraj segmenta RNA završava cisteinom nakon STOP kodona. Duljine 3' i 5' nekodirajućih terminalnih sekvenci specifične su za svaki pojedini protein. Duljine tih segmenata su iste za iste gene većine sojeva virusa, uz iznimku 3' kraja sedmog i desetog segmenta koji mogu varirati. Poliadenilacija na 3' kraju u potpunosti izostaje. Gotovo svi segmenti virusa su jedan cjeloviti otvoreni okvir čitanja, tj. nema egzona i introna. Svi segmenti su bogati A+T baznim parovima i spareni su od kraja do kraja. Uočene su regije koje potencijalno uspostavljaju intramolekulske (sekundarne) interakcije pozitivne okosnice RNA na terminalnom kraju 4, 10 i 11 segmenta. Pretpostavlja se da imaju značajnu biološku ulogu tijekom virusne replikacije i transkripcije, one otežavaju i stvaranje dsDNA na temelju dostupne RNA. Usporedbom sekvenci individualnih segmenata različitih virusa grupe A rotavirusa vidljivo je da do promjena dolazi genetičkim shiftom i driftom mehanizmima analognim onima prisutnim u grupi A infuenza virusa. Usporedbom sekvenci koje kodiraju neutralizirajući glikoprotein VP7 za 27 humanih i animalnih virusa, koji svi imaju tip 3 VP7, ukazuje na postojanje za vrstu specifičnih sekvenci unutar tog gena, kao i serotip specifičnih sekvenci. Odnedavno postoji pretpostavka koja upućuje da je antigenska kompozicija pod utjecajem interakcija specifičnih kombinacija proteina dvije vanjske kapside, što se postiže dodavanjem tripsina ili oligosaharida na glikoproteine vanjske ovojnice.



Slika 1. Grafički prikaz genomske strukture rotavirusa, (web 1).

2.3. Struktura i funkcija rotavirusnih proteina

VP1 je strukturni protein koji je kodiran segmentom 1 u svim do sada poznatim rotavirusima i jedan je od tri strukturna proteina (VP1, VP2, VP3) koji se nalaze na jezgrenoj kapsidi virusa. Radi se o malom proteinu molekularne mase od 124.847 kDa, blago je bazičan i hidrofoban (web2). VP1 se u malim količinama može pronaći u raznim virionima, što ukazuje na to da ovaj protein nema važnu strukturnu ulogu, već da je dio enzimskog kompleksa. Zanimljiva je njegova značajka slabe reakcije u tehnikama imunoprecipitacije i imunoblotu sa hiperimunim antiserumima dobivenih od pročišćenih virusnih čestica ili serumom dobivenim od prirodno zaraženih životinja ili djece. Serumi dobiveni od životinja u koje je unesen VP1 sintetiziran baculovirusom može precipitirati VP1. Pretpostavlja se da je takva reakcija rezultat teške dostupnosti VP1 imunološkom sustavu tijekom zaraze.

VP2 je kodiran segementom 2 i količinski je najdominantniji strukturni protein jezgrene kapside i najbrojniji je strukturni protein jedno obavijene virusne čestice i istraživanja ukazuju na to da je on djelomično dostupan imunološkom sustavu u obliku jednoobavijenih virusnih čestica (web 1). To je potvrđeno mogućnošću reakcije antitijela sa jednoobavijenim česticama pri tehnici ELISA. VP2 je jedini strukturni protein koji ima sposobnost vezanja nukleinskih kiselina, s time da ima veći afinitet za vezanje na ssRNA nego na dsRNA, ali bez afiniteta za specifičnu sekvencu. Analizom sekvence VP2 uočena je velika količina leucina na svakom sedmom aminokiselinskom ostatku od aminokiseline 536 do 665. Pretpostavlja se da to područje bogato leucinskim ostatcima predstavlja dio proteina koji mijenja konformaciju za pristajanje na specifični dio DNA molekule. VP2 je miristiliran i iako je biološka funkcija ove preinake nepoznata, one su prisutne u drugim virusnim sustavima gdje su miristilirani proteini važni za formiranje novih virusnih čestica.

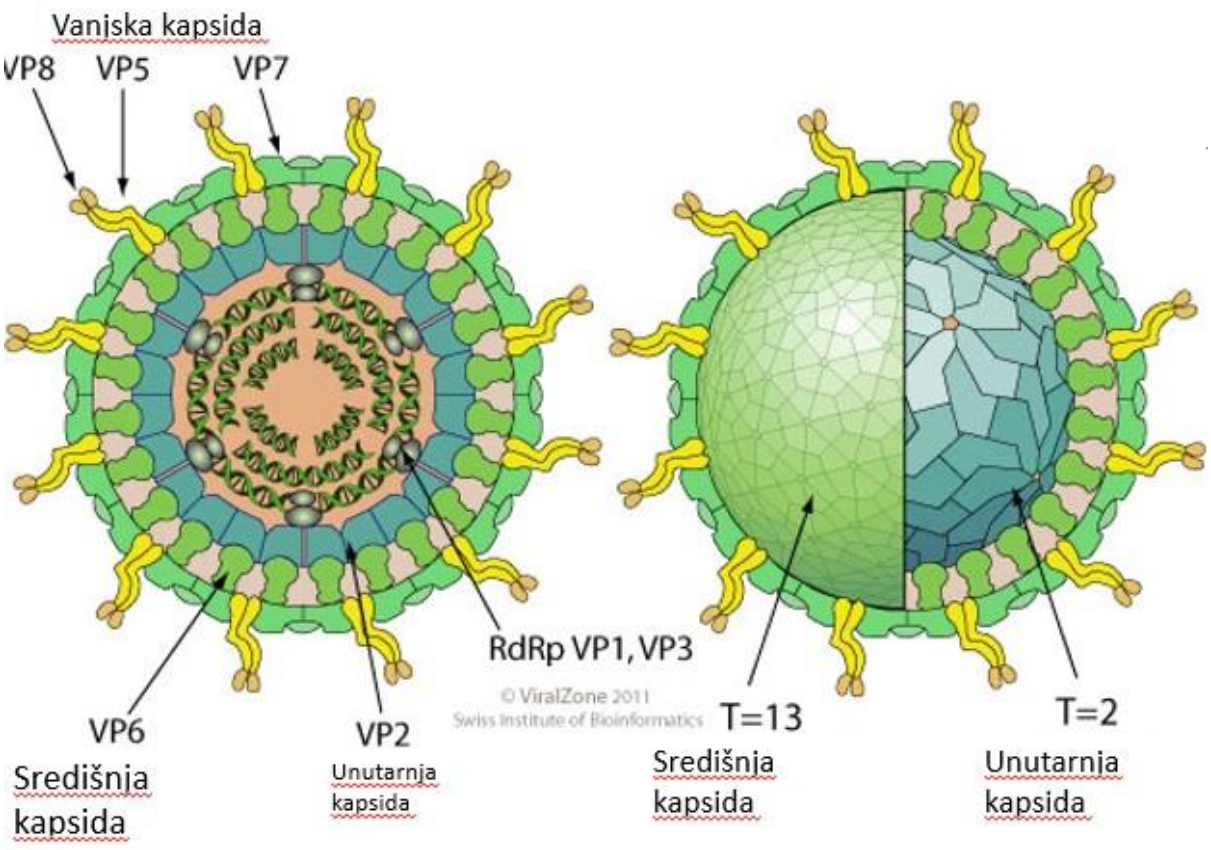
VP3 je kodiran segmentom 3 i mali je strukturni protein, sami segment upućuje na to da kodira protein od 835 aminokiselinskih ostataka, molekularne težine od 98120 kDa (web 1). Radi se o bazičnome proteinu koji ima višestruka ponavljanja sekvenci i uočena je sličnost sa RNA polimerazama drugih virusa, pa je pretpostavka da sudjeluje u replikaciji.

VP6 je strukturni protein koji se nalazi u velikoj količini na vanjskoj membrani jednoobavijenih virusnih čestica, a kodira ga segment 6. Radi se o trimeru koji sudjeluje u stvaranju tubula uslijed specifičnog slijeda aminokiselinskih ostataka (posljedica njegove primarne strukture).

To se može zaključiti na temelju činjenice da se on sintetizira bez prisutnosti ostalih virusnih proteina. VP6 će formirati tubule i bez prisutnosti bilo kakvih virusnih elemenata ukoliko se nalazi u mediju niske pH vrijednosti. Uklanjanjem VP6 sa površine jednoobavijenih čestica uzrokuje gubitak sposobnosti traskripcije (ponovno inkorporiranje VP6 vraća sposobnost transkripcije, a u prekomjernoj količini se transkripcija inhibira), s obzirom na to smatra se da sudjeluje u aktivnosti polimeraze, ali se ne zna ima li konkretnu ulogu u transkripciji.

VP4 je proteinski produkt genomskog segmenta 4 i radi se o neglikoziliranom strukturnom proteinu i hemaglutininu u više različitih sojeva virusa (web 1). U prisutnosti tripsina VP4 se cijepa u VP5, a potom u VP8 čime dolazi do pojačavanja infektivnosti. Cijepanjem VP4 uočena je bolja mogućnost penetracije (ali ne i vezanja) virusa u stanicu domadara. U animalnih virusa VP4 se sastoji od 756 aminokiselinskih ostataka, a u humanih virusa od 755 aminokiselinskih ostataka, dakle humani virus je izgubio jednu aminokiselinu na 136 mjestu i VP8 je u ljudi kraći za jednu aminokiselinu. Biokemijska istraživanja su utvrdila da je protein pomalo hidrofoban i da pri neutralnom pH (pH=7) ima negativan naboj. Proučavanjem sekundarne strukture amino terminus proteina sadrži veliki broj zaokreta upućujući na globularnu strukturu proteina. Četiri cisteinska ostatka na mjestima 216, 318, 380 i 774 su prisutna u gotovo svim rotavirusima i jedan dodatni cisteinski ostatak je prisutan na 266 mjestu i 203 mjestu. Pretpostavlja se da se mjesto cijepanja zadržava dostupnim stvaranjem disulfidnih interakcija na 203 i 216 u VP8, i 313 i 330 u VP5.

VP7 je drugi najbrojniji kapsidni protein i kodira ga segment 7 od SA11 (Slika 2). Ovaj vanjski glikoprotein ima imunogenska svojstva i uvjetuje nastajanje neutralizirajućih antitijela. Ovaj glikoprotein ima veliki broj N-vezanih manoznih oligosaharidnih ostataka koji se dodaju kontranslacijom tijekom pupanja u endoplazmatski retikulum.

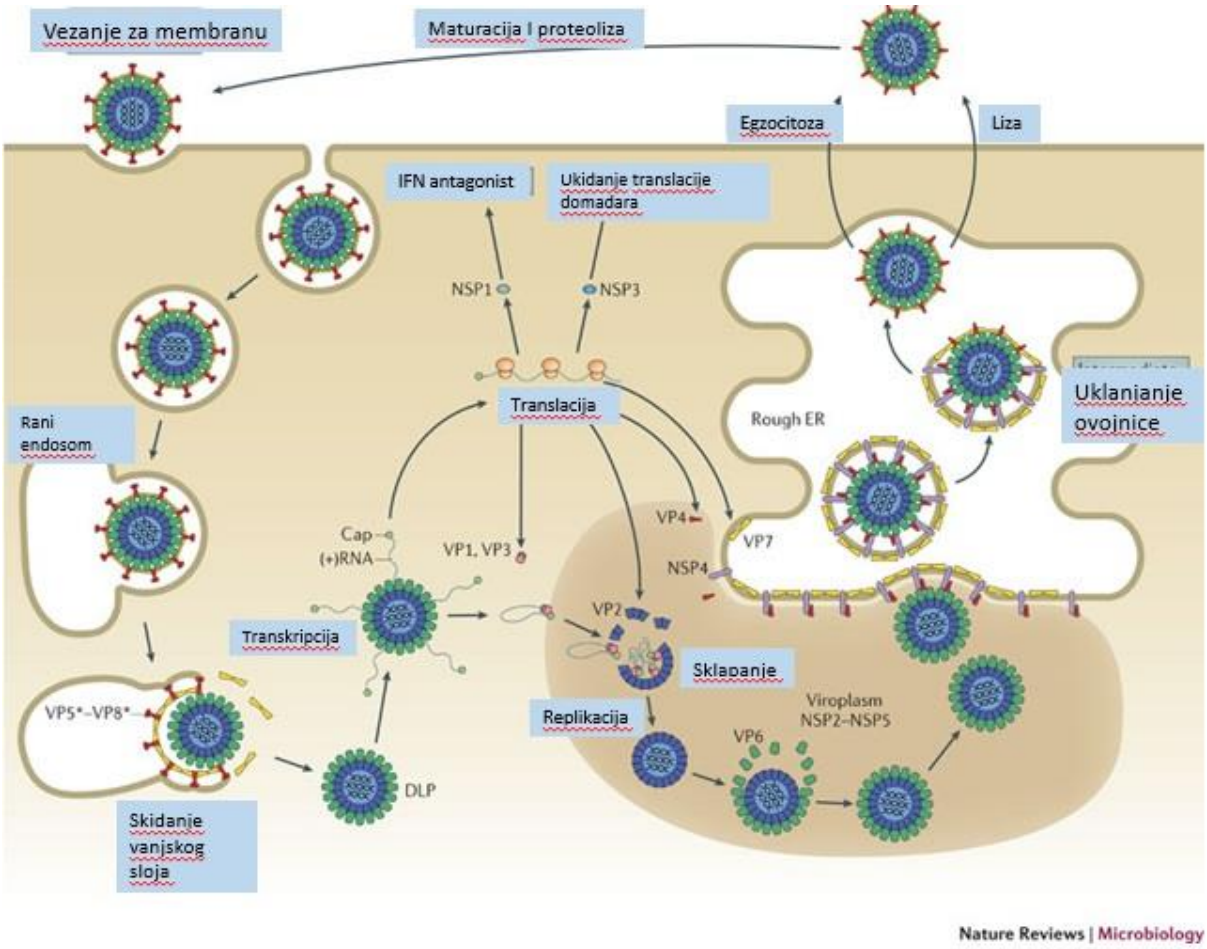


Slika 2. Građa rotavirusa, (web 1)

2.4. Replikacija rotavirusa

Rotavirusni virion se veže za domadarsku stanicu uz pomoć hemaglutinina koji prepoznaje sijalinsku kiselinu glikoproteina (VP8 nastaje cijepanjem VP4 u VP5, a zatim VP5 u VP8) (web 3). Endocitozom (koja nije potaknuta vezanjem klatrina ili kaveolina) nastaje endosom, u kojemu se zbog niske koncentracije kalcija skida vanjski kapsidni sloj tako da ostaje samo dvoslojna ovojnica (Slika 3). Skidanje vanjske ovojnice potiče aktivaciju RNA polimeraznog kompleksa (VP1 i VP3) za transkripciju pozitivne RNA ((+)RNA) iz cijelog segmentiranog dsRNA genoma. (+)RNA služe kao mRNA za sintezu virusnih proteina uz pomoć ribosoma domadarske stanice, ili za sintezu (-)RNA lanca tijekom replikacije. Ne-strukturni proteini NSP2 i NSP5 sudjeluju u stvaranju viroplazmi (vezikule u citoplazmi domadarske stanice) koje služe za usmjeravanje komponenata potrebni za virusnu replikaciju i sklapanje subviralnih čestica. Pakiranje repliciranog genoma je potaknuto vezanjem 3' kraja (+)RNA s VP1 i VP3. Smatra se da međusobne interakcije između 11(+)RNA potiču sklapanje kompleksa za slaganje virusa.

Kondenzacija strukturnog proteina unutarnje kapside, VP2, oko kompleksa za slaganje potiče sintezu dsRNA uz pomoć VP1. Središnji kapsidni protein VP6 se zatim veže za novoformiranu jezgru virusa i stvara dvostrukoobavijenu subvirusnu česticu (web 3). Trenutno se sklapanje vanjske kapsidne ovojnice ne razumije u potpunosti; pretpostavlja se da interakcija transmembranskog rotavirusnog proteina, NSP4, usmjerava dvostrukoobavijenu česticu i VP4 prema citosolnoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma. Još nepoznatim mehanizmom kompleks dvostrukoobavijene čestice- VP4- NSP4 uzrokuje pupanje membrane u lumen endoplazmatskog retikuluma. Uklanjanje membrane endoplazmatskog retikuluma i NSP4 omogućava vezanje vanjske kapsidne ovojnice sa strukturnim proteinom VP7. Liza domadarske stanice i oslobađanje novoformiranih virusnih čestica u lumen crijeva, izlaže virusne čestice tripsinskim proteazama. Proteaze provode kovalentnu modifikaciju vanjskih strukturnih proteina i omogućuju daljnju infekciju domadara.



Slika 3. Ciklus replikacije rotavirusa, (web 3)

Replikacija dsRNA virusa se znatno razlikuje od replikacije ssRNA virusa. SsRNA ili retrovirusi sadržavaju RNA genome u svojim virusnim česticama, ali se repliciraju sintezom DNA-provirusa koji se integrira u kromosomsku DNA domadarske stanice. DNA kopija virusne RNA sintetizira se virusnim enzimom reverzna transkriptaza. Reverznom transkripcijom nastaje molekula DNA koja ima ponavljanja od nekoliko stotina nukleotida na oba kraja. Ova ponavljanja koja se zovu duga terminalna ponavljanja nastaju duplikacijom onih mjesta virusne RNA za koja se vežu početnice kako bi inicirale sintezu DNA. Prema tome ti sljedovi imaju središnju ulogu u reverznoj transkripciji, a uz to su uključeni u integraciju i naknadnu transkripciju provirusne DNA.

Dok se dsRNA virusi repliciraju enzimom RNA polimeraze, koja katalizira polimerizaciju ribonukleozid-5'-trifosfata (NTP) usmjerenu kalupom (u ovom slučaju (+)RNA). Sinteza katalizirana RNA polimerazom je slična sintezi kataliziranoj DNA polimerazom. Rast lanca je uvijek u smjeru 5'-3', prema tome možemo zaključiti da je (+)RNA usmjerena 3'-5'. Međutim za aktivnost RNA polimeraze nije potrebna klica.

2.5. Odgovor stanice na infekciju- važnost PKR

dsRNA ovisna proteinska kinaza (PKR) je antiproliferativna i antiviralna molekula koja se aktivira pojavom dsRNA unutar stanice domadara (web 2). Ona je najbolje proučeni član porodice kinaza ovisnih o α inicijacijskom faktoru 2. Radi se o serin/treonin kinazi koja pokazuje sposobnost autofosforilacije (prilikom aktivacije kinaze) i fosforilacije eIF-2α čime se inhibira aktivnost tog inicijacijskog faktora i onemogućava se proteinska sinteza stanice (ako nema proteinske sinteze, nema niti sinteze novih virusnih čestica). Osim sposobnosti fosforilacije i defosforilacije, ona ima ulogu u signalnoj transdukciji i transkripcijskoj kontroli IκB/NF-κB puta. PKR je jedna od proteinskih kinaza sisavaca (PERK, GCN2 i HRI) koja ima sposobnost fosforilacije eIF-2α kao rezultat stresnog odgovora (uglavnom kao odgovor na virusnu infekciju). Fosforilacija eIF-2α na S51 ostatku sprječava recikliranje ovog faktora, što je potrebno za normalno odvijanje translacije. PKR ima dvije domene: domena za fosforilacije eIF-2α i domena za vezanje dsRNA koja regulira njezinu aktivnost. Akumulacijom dsRNA u stanici PKR se dimerizira i prekida sveukupnu translaciju stanice. Fosforilacija PKR na Thr446 ostatku omogućava prepoznavanje supstrata i fosforilaciju. Prepoznavanje eIF-2α uključuje

interakciju αG heliksa i fosfo-vezujućim aktivnim mjestom između dva lobula proteinske kinaze. αG-heliks prvi ulazi u interakciju s eIF-2α i uzrokuje konformacijske promjene koje postavljaju S51 ostatak bliže foso-vezujućem aktivnom mjestu.

U sisavaca eIF-2α usmjerava Met-tRNA prema 40S podjedinici ribosoma i označava početak translacije. Taj inicijacijski faktor se sastoji od tri podjedinice: α, β i γ; veže Met-tRNA zajedno s GTP-om i tvori tercijarni kompleks. Nakon vezanja Met-tRNA na 48S kompleks i hidrolize GTP-a potaknuto eIF-5. Vezani GDP se uklanja sa eIF-2α i veže se GTP uz aktivnost eIF-2B. Aktivnost eIF-2α je regulirana fosforilacijom S51 ostatka na svojoj α podjedinici. U stanicama koje nisu pod stresom uzrokovanim virusnom infekcijom PKR se nalazi u monomernom latentnom stanju. Osim s dsRNA, PKR se može aktivirati i prisutnošću heparina, poli-L-glutamina i dekstran sulfata. DsRNA se prepoznaje i veže za monomer PKR sa N-terminalnim ponavljajućim sekvencama što uzrokuje dimerizaciju i autofosforilaciju. Domena za vezanje dsRNA se sastoji od 70 aminokiselinskih ostataka i kratkim linkerom od 20 aminokiselina. Ovakva građa omogućava vezanje dsRNA oko PKR i osigurava dobru protein-RNA interakciju. Vezanjem RNA, PKR prolazi kroz niz konformacijskih promjena i autofosforiliraju se aminokiselinski ostatci na području aktivirajućeg segmenta.

2.6. Laboratorijska dijagnostika

Neki rotavirusi se mogu izolirati u staničnoj kulturi (stavljanjem tripsina u staničnu kulturu). Uzorak za izolaciju virusa jest ispirak ždrijela i obrisak rektuma. Dokaz da je izolacija uspješna je slika snimljena elektronskim mikroskopom. Postoje dvije tehnike elektronske mikroskopije: direktna i imunoelektronska mikroskopija (IEM). Dva tipa IEM tehnike se najčešće primjenjuju, SIEM gdje se uzorak s virusom inkubira sa specifičnim antitijelima prije bojanja i SPIEM gdje su na podlozi vezana antitijela koja služe "hvatanju" virusa iz uzorka. Međutim za dokazivanje kontakta pacijenta s virusom, tehnika elektronske mikroskopije je dugotrajna i skupa, pa se stoga rutinski ne koristi. Tehnika detekcije antigena virusa koji se specifično vežu s antitijelima je brža i jeftinija pa se koristi rutinski za veliki broj različitih sojeva virusa. U serološkoj dijagnostici infekcija reovirusima iskorištava se reakcija vezanja komplemenata (dokazivanje grupnospecifičnih protutijela), te testovi neutralizacije i inhibicije hemaglutinacije za dokazivanje tipnospecifičnih protutijela u parnim serumima bolesnika.

U Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije se koristi "DIAQUICK" Rota/Adeno Combi Cassette. Rota/Adeno Combi Cassette je imunokromatografski test koji specifično veže antitijela adeno i rotavirusa. Alikvot razrijeđenog uzorka stolice se unosi u predviđeni dio testne posudice. Uzorak se kreće kroz uložak na kojemu se nalaze antitijela adeno i rotavirusa vezane na crveno vezano koloidno zlato. Ako se u uzroku nalaze antigeni virusa, oni će se vezati za antitijela na ulošku i formirati će se kompleks : antigen-antitijelo-koloidno zlato. Ovaj vezani kompleks se kreće po nitroceluloznoj membrani pod utjecajem kapilarnih sila prema području gdje se antitijela adenovirusa i rotavirusa međusobno odvajaju ('test line'). Kako se taj vezani kompleks približava području 'test line', dolazi do dolazi do vezanja za antitijelo virusa na membrani i formirati će se linija. Crvena kontrolna linija će se uvijek vidjeti u prozorčiću testne kutije kako bi mogli biti sigurni da smo točno nanijeli uzorak i da se test odvija točno. Ako osoba nije zaražena, ili je virus prisutan u koncentracijama manjim od osjetljivosti testa, biti će prikazana samo kontrolna crvena linija, ako ona nije vidljiva test je nevažeći. Ukoliko je osoba zaražena rotavirusom i test je pravilno izveden pojaviti će se linija na C i R području (od tri moguća područja: C, A, R, okomito od gore prema dolje). Ukoliko se linija pojavi samo u području C tada je rezultat negativan.

2.7. Podatci Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije

Rezultati seroloških testova u 2014. godini.

01.01.-30.06.2014.		pozitivno	negativno	ukupno
	Rotavirus Ag	191	2108	2299
	Adeno virusi Ag	25	2274	2299
01.01.-31.12.2014.				
	Rotavirus Ag	324	4143	4468
	Adeno virusi Ag	35	4432	4468

Iz rezultata je vidljivo da je rotavirus daleko zastupljeniji od adenovirusa na području Osječko-baranjske županije. Dakle unutar jedne godine 7% pacijenata je bilo testirano pozitivno na rotavirus, a samo 0,7% na adenovirus. Od toga tijekom perioda od 1. siječnja do 30. lipnja se dogodilo 58% sveukupnih infekcija rotavirusom i čak 71% svih infekcija adenovirusom. Postoje razne teorije zašto se najviše infekcija pojavljuje tijekom zime i proljeća, pretpostavlja se da je veća vjerojatnost da ljudi dolaze u bliži kontakt jedni s drugim tijekom zime zbog povećane tendencije da ostaju u zatvorenim prostorima. Djeca se vraćaju u školu ili vrtić nakon praznika pa je veća šansa za pojavu infekcije. Rotavirusom se osoba može zaraziti tijekom cijele godine. Zarazi su podložnija novorođenčad zbog slabo razvijenog imunološkog sustava (tijekom prvih šest mjeseci života dijete štite majčina antitijela, a kasnije se razvija humoralna i stanična imunost aktivno zarazom ili pasivnom imunizacijom). Reakcije na infekciju su burnije u male djece. Naime kada se patogen nađe u tijelu makrofagi pomažu aktivaciju limfocita endocitozom patogena i njihovom razgradnjom. Tada se aktiviraju limfociti T i B, limfociti B su odgovorni za humoralnu imunost, a limfociti T za staničnu imunost. Aktivacijom limfocita dio njih će uništiti patogen, a dio će ostati u inaktiviranom stanju i pohraniti će se do sljedećeg podražaja od strane makrofaga. Tako će sljedeća reakcija na sljedeću infekciju biti blaža i ona će se “sanirati“ brže

3. 3. Zaključak

Rotavirus je jedan od najčešćih uzročnika gastroenteritisa u dojenčadi i male djece. Radi se o dvolanačanom RNA virusu s tri kapsidne ovojnice. Prema podatcima Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, veći broj infekcija se događa u periodu od 1. siječnja do 30. lipnja. Čak 58% rotavirusnih infekcija događa se u navedenom periodu zajedno s 71% adenovirusnih infekcija. Unatoč dobivenim rezultatima ne može se korelirati učestalost infekcija s godišnjim dobom. Imunološki odgovor na infekciju u male djece je jači nego u odrasle osobe. Specifičnog lijeka za infeciju nema. U bolesnika inficiranih rotavirusima najvažnije je održavanje adekvatnog intravaskularnog volumena. Nekoliko goveđih i jedan soj virusa izoliran iz stolice rezus majmuna uporabljuju se za izradu cjepiva. Trenutno se ta cjepiva evaluiraju i nisu spremna za široku primjenu.

4. 4. Literatura:

Estes MK, Kapikian LT, 2007. *Rotaviruses* Vol.2, fifth ed. Fields of Virology.

Guglielmi KM, McDonald SM, Patton JT. 2010. Mechanism of intraparticle synthesis of the Rotavirus double-stranded RNA genome. *J BiolChem* 285 (24): 18123- 18128.

Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Tortorici MA, Taraporewala ZF. 2007. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Adv Virus Res* 69: 167-201.

Trask SD, McDonald SM, Patton JT. 2012. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* 10: 165-177.

Web stranice

web 1: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html

web 2: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.sci-hub.org/pmc/articles/PMC1698511/

web 3:
http://www.nature.com/nrmicro/journal/v10/n3/fig_tab/nrmicro2673_F2.html#close