

## МОЛЕКУЛАРНА ЕПИДЕМИОЛОГИЈА РОТАВИРУСА КОД ДЕЦЕ ПРЕДШКОЛСКОГ УЗРАСТА

Биљана ВУЛЕТИЋ<sup>1</sup>, Слободан ОБРАДОВИЋ<sup>1</sup>, Елизабета РИСТАНОВИЋ<sup>2</sup>,  
Гордана КОСТИЋ<sup>1</sup>, Петар РАДЛОВИЋ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Педијатријска клиника, Клиничко-болнички центар „Крагујевац“, Крагујевац; <sup>2</sup>Војномедицинска академија, Београд; <sup>3</sup>Институт за гинекологију и акушерство, Клинички центар Србије, Београд

### КРАТАК САДРЖАЈ

Многе епидемиолошке студије у развијеним и земљама у развоју показале су да је ротавирус важан етиолошки агенс тешких дијарејних обољења код деце предшколског узраста. Последњих година су развијене бројне биохемијске технике за генетску и фенотипску анализу овог вируса. Помоћу технике електрофорезе у полиакриламид-гелу могуће је утврдити генетске разлике међу различитим типовима ротавируса који се изолују из столица оболеле деце, те на основу тога одредити прецизан сој вируса који циркулише у једној популацији. У периоду од 1998. до 2000. године испитана су 124 узорка столице код деце узраста до пет година с подручја Крагујевца и шире околине. Код све деце дијагностикована је акутна инфективна дијареја. *ELISA* тестом је код 13 узорака (10,3%) изолован ротавирус. Екстракција вирусне РНК је вршена директно из узорка столице, а затим је обављана електрофореза и сваки препарат је посматран под ултраљубичастом лампом и фотографисан. Анализа вирусне РНК електрофорезом у полиакриламид-гелу показала је у свим узорцима истоветну покретљивост сегмената вирусног генома. Резултати анализе вирусне РНК електрофорезом у полиакриламид-гелу код свих наших испитаника показали су присуство једног типа ротавируса. Овај налаз би могао бити последица дугогодишње изолације и ограничене флукуација становништва, али он ни у ком случају не значи да се у наредном периоду не могу изоловати и други типови ротавируса.

**Кључне речи:** ротавирус; електрофореза РНК; деца

### УВОД

Многе епидемиолошке и клиничке студије широм света показале су да је ротавирус главни етиолошки агенс тешких дијарејних обољења код одојчади и деце узраста до две године [1]. У последњих неколико година су развијене бројне биохемијске технике за генетску и фенотипску анализу вируса. То су: техника моноклонских антитела, пептидно мапирање, тзв. *finger printing*, РНК-РНК хибридизација, електрофореза РНК у полиакриламид-гелу и друге [2].

### ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се помоћу технике електрофорезе у полиакриламид-гелу утврде биолошке и генетске разлике међу ротавирусима који су изоловани из столица оболеле деце, да се изврши њихова типизација и утврди број сојева који циркулише у нашој популацији.

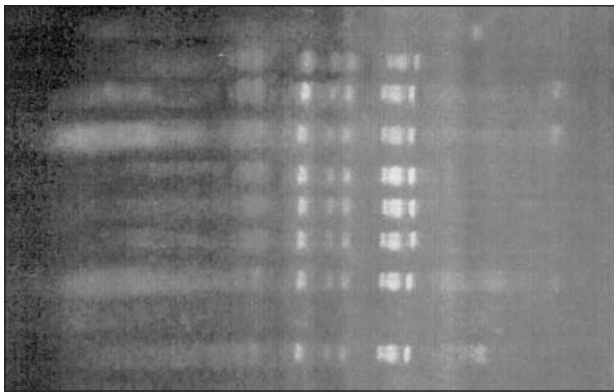
### МЕТОД

Истраживање је вршено од децембра 1998. до маја 2000. године. Испитивана су деца оболела од акутног дијарејног поремећаја чији су клинички налази одговарали дијагностичким критеријумима акутне инфективне дијареје. Сва деца су лечена на Педијатријској клиници Клиничко-болничког центра у Крагујевцу. У току истраживања испитано је 124 деце. Од испитаника су узимани узорци столице и анамнестички подаци о почетку и току болести. Да би се утврдиле че-

стице вируса, столице су прегледане *ELISA* тестом а претходно стандардним методима бактериолошке дијагностике, при чему нису изоловане патогене цревне бактерије. За откривање разлике између појединих сојева ротавируса које се не могу открити другим методима примењује се електрофореза у полиакриламид-гелу (*PAGE*). То је биохемијска техника која се заснива на различитој покретљивости сегмената серумске РНК у *PAGE*, у зависности од њихове молекулске масе. Поступак је следећи: сваки појединачни узорак столице претходно чуван на  $-20^{\circ}\text{C}$  растваран је у  $1,5\text{ ml}$  пуфера за екстракцију док се не добије средње густа суспензија. Она се потом центрифугира 30 минута на  $2500\text{ rpm}$ . У току даљег рада се користи само супернатант. Он се меша с једнаким волуменом засићеног фенола и центрифугира пет минута на  $12000\text{ g}$  у минути. Супернатант се меша са  $2,5\text{ V}$  апсолутног етанола и чува током ноћи на  $-20^{\circ}\text{C}$  да би се РНК испреципитирала. Пре nanoшења на гел преципитат РНК је седиментиран центрифугирањем на  $12000\text{ g}$  у минути а етанол је уклоњен. Преципитирана РНК је ресуспендована у  $15-20\text{ }\mu\text{l TE}$  пуфера. Узорак је тако припремљен за електрофорезу. Она се обавља на  $60\text{ V}$  до уласка у гел, а потом на  $100\text{ V}$ . По завршетку електрофорезе посматра се под ултраљубичастом лампом и фотографише [3].

### РЕЗУЛТАТИ

Наша истраживања, заснована на примени *PAGE*, показала су једнаку покретљивост свих сегмената вирусне РНК, односно присуство истог типа ротавируса као узрочника болести код свих наших испитаника (Слика 1).



СЛИКА 1. Електрофоретска покретљивост сегмената РНК у полиакриламид-гелу.

FIGURE 1. Electrophoretic mobility of RNA segments in polyacrylamide gel

## ДИСКУСИЈА

У оквиру генотипске и фенотипске анализе ротавируса методом електрофорезе у полиакриламид-гелу могли смо утврдити биолошке и генетске разлике међу ротавирусима који циркулишу у нашој популацији, што би, с практичне тачке гледишта, било значајно за превенцију ове инфекције путем имунопрофилактике [4]. Међутим, изоловали смо исти тип ротавируса који се међусобно нису разликовали по покретљивости сегмената вирусног генома. Овакав налаз би могла објаснити наша дугогодишња изолација и изостанак нормалне флукуације становништва, како у оквирима локалног простора, тако и на међународном нивоу. Затварање у све уже животне просторе и смањење кретања народа је довело до формирања устаљених и истих типова вируса који су изазивачи инфекција на нашим просторима. У испитивањима у свету су утврђене велике разлике у броју типова ротавируса који се могу открити применом технике

PAGE, а има их од два до 32 типа [5-9]. Ови резултати не значе да геном ротавируса који циркулише на нашим просторима неће бити подложен променама у будућности те створити нове типове вируса. То је нарочито значајно за даљи рад на изучавању вирусне етиологије дијареје и за даљи рад на проналажењу што ефикаснијих мера заштите од ових инфекција.

## ЗАКЉУЧАК

Епидемиолошка студија обављена на ширем подручју Крагујевца у периоду од децембра 1998. до маја 2000. године показала је присуство само једног типа ротавируса као изазивача акутног гастроентеритиса код деце узраста до пет година.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kids Health Organization. Rotavirus. Dostupno na: <http://www.healthnew.org>.
2. Krstić Lj. Klasifikacija i nomenklatura virusa. U: Krstić Lj. Medicinska virusologija. Beograd: Čigoja; 2001. p.65-79.
3. Cniped M, Howmey PM, et al. Fields virology. 2<sup>nd</sup> ed. Lipincott: Williams&Wilkins; 1990. p.1353-99.
4. Krstić LJ, Mehmedbašić I. Molekularna epidemiologija rotavirusa u Jugoslaviji. Zbornik radova. V Jugoslovenski kongres infektologija, Portorož 1987; p. 287-290, K-05.
5. Colomina J, Gil MT, Codoner P, et al. Viral proteins VP2, VP6 and NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies in children with Rotavirus symptomatic infection. J Med Virol 1998; 56-65.
6. Holmes JL, Krikwood CD, Gerna G, et al. Characterisation of usual G 8 Rotavirus strains isolated from Egyptian children. Arch Virol 1999; 7:1381-96.
7. Palombo EA, Bugg HC, Bishop RF. Characterisation of rearranged NSP5 gene of a human Rotavirus. Acta Virol 1998; 42(1):55-59.
8. Sack B. Current treatment of infectious diseases. Infect Med 1996; 13(4):301-13.
9. Heatburn, GERDA&Digestive. Diarrhea. Dostupno na: <http://www.health.yahoo.com/Health/Centers/Digestive/37>.

## MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF ROTAVIRUSES IN PRESCHOOL CHILDREN

Biljana VULETIĆ<sup>1</sup>, Slobodan OBRADOVIĆ<sup>1</sup>, Elizabeta RISTANOVIĆ<sup>2</sup>, Gordana KOSTIĆ<sup>1</sup>, Petar RADLOVIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Paediatric Clinic, Medical Health Centre "Kragujevac", Kragujevac; <sup>2</sup>Military Medical Academy, Belgrade;

<sup>3</sup>Institute for Gynaecology and Obstetrics, Clinical Centre of Serbia, Belgrade

### ABSTRACT

Numerous epidemiological studies, conducted in both developed and developing countries, have shown that the rotavirus is an important aetiological agent in severe diarrhoeal diseases among preschool children. In recent years, different biochemical techniques for the genetic and phenotypic analysis of rotaviruses have been developed. The aim of this study was to define the biological and genetic differences among rotaviruses isolated from the faeces of affected children, by using the Polyacrylamide Gel Electrophoresis technique, as well as to type the viruses and establish the number of strains circulating within our population. In total, 124 faeces samples from children up to 5 years of age were analysed. With the use of the ELISA test, rotaviruses were isolated in 10.3% of cases. The extraction of viral RNA was carried out directly from the faeces samples, which was followed by electrophoresis, and finally observation using a UV lamp, and documentation with a

photo camera. The analysis of viral RNA, using Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), revealed equal mobility in all segments of the genome. The results of our analysis demonstrated that the same strains of rotaviruses do circulate within our population. Such a result can be explained as a consequence of our years-long isolation as well as of the decreased mobility of our population. However, the results do not signify that the rotavirus genome in this region will not be susceptible to variations and that, consequently, new strains will not be created.

**Key words:** rotavirus; RNA electrophoresis; children

Biljana VULETIĆ  
Episkopa Save 9/1, 34000 Kragujevac  
Tel: 034 340 212  
E-mail: sibil@ptt.yu

\* Рукопис је достављен Уредништву 23. 7. 2004. године.