

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja BRAČKO

**DOKAZOVANJE ASTROVIRUSNIH OKUŽB Z
RT-PCR V REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja BRAČKO

**DOKAZOVANJE ASTROVIRUSNIH OKUŽB Z RT-PCR V
REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF ASTROVIRUS INFECTIONS USING REAL-TIME
RT-PCR METHOD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Avšič-Županc, za somentorja asist. dr. Andreja Steyer in recenzenta doc. dr. Miroslava Petrovca.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Avšič-Županc

Somentor: asist. dr. Andrej Steyer

Recenzent: doc. dr. Miroslav Petrovec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ-ŽUPANC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: asist. dr. Andrej STEYER
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Bračko

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.2+578.7 : 616.34(043)=163.6
- KG virusi/človeški astrovirusi/astrovirusne okužbe/diagnostične metode/ELISA/RT-PCR v realnem času
- AV BRAČKO, Tanja
- SA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (mentorica)/STEYER, Andrej (somentor)/PETROVEC, Miroslav (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2010
- IN DOKAZOVANJE ASTROVIRUSNIH OKUŽB Z RT-PCR V REALNEM ČASU
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VIII, 35 str., 4 pregl., 12 sl., 46 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Človeški astrovirusi so v zadnjih letih prepoznani kot pomembni povzročitelji akutnega virusnega gastroenteritisa pri otrocih. Okužbam so izpostavljeni tudi starejši in imunsko oslabei posamezniki. Namen naloge je bil uvesti in optimizirati visoko občutljivo in hitro molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR v realnem času), za dokazovanje astrovirusov v iztrebkih bolnikov, obolelih za gastroenteritisom. Naredili smo tudi primerjavo do sedaj uporabljene encimskoimunske metode (ELISA ProSpecT) za dokazovanje astrovirusnih antigenov, z RT-PCR v realnem času. Pri testiranju kliničnih vzorcev smo s testom ELISA določili kar 44 % lažno pozitivnih rezultatov. Ostalih 56 % vzorcev smo analizirali glede na starost bolnikov. Večina bolnikov (45/66) z dokazano astrovirusno okužbo je bilo mlajših od 5 let. Ugotavljali smo tudi občutljivost ter specifičnost testa ELISA, glede na RT-PCR v realnem času. Občutljivost testa je znašala 33 %, specifičnost pa 98 %. Predvidevamo, da zaradi nizke občutljivosti encimskoimunski test ni primerna metoda za dokazovanje sporadičnih astrovirusnih okužb.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 578.2+578.7 : 616.34(043)=163.6

CX viruses/human astroviruses/astrovirus infections/diagnostic methods/ELISA/real time RT-PCR

AU BRAČKO, Tanja

AA AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana (supervisor)/STEYER, Andrej (co-advisor)/
PETROVEC, Miroslav (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2010

TI DETECTION OF ASTROVIRUS INFECTIONS USING REAL-TIME RT-PCR
METHOD

DT Graduation Thesis (University studies)

NO VIII, 35 p., 4 tab., 12 fig., 46 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Human astroviruses are recognised as one of the important causes of acute viral gastroenteritis mainly in young children worldwide and a clinically important pathogen in the elderly and the immunocompromised as well. The aim of the study was to develop a molecular method of a real time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR) in order to increase the sensitivity and minimize the time required for the detection of human astroviruses in stools of patients with gastroenteritis. In addition the monoclonal antibody-based enzyme immunoassay (ELISA ProSpecT) for the detection of viral antigen was compared to the real time RT-PCR assay. Our results showed that 44% of all positive samples detected by ELISA were false positive. True positive samples (56%) were analysed by patient's age. Most patients (45/66) were under the age of 5. ELISA was compared to RT-PCR real time as a gold standard. The sensitivity and specificity of ELISA was 33% and 98%, respectively. Thus, due to the low sensitivity of the assay we suggests that ELISA is inappropriate diagnostic method for screening of sporadic astrovirus infections.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED	3
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV	4
2.3 STRUKTURA VIRUSA	5
2.4 ASTROVIRUSNE OKUŽBE PRI LJUDEH	6
2.4.1 Patogeneza	6
2.4.2 Klinični znaki in zdravljenje	7
2.4.3 Imunost	7
2.4.4 Epidemiologija	8
2.5 DIAGNOSTIKA	9
2.5.1 Elektronska mikroskopija	9
2.5.2 Dokazovanje virusnih antigenov	9
2.5.3 Molekularne metode	10
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Klinični vzorci	14

3.1.2	Materiali in reagenti za encimskoimunski test ProSpecT (Oxoid)	14
3.1.3	Komercialni komplet za osamitev virusne RNA z iPrep PureLink Virus kompletom (Invitrogen)	14
3.1.4	Reagenti za reakcijo RT-PCR v realnem času s kitom AgPath-ID™ (Ambion).....	15
3.1.5	Material za analizo PCR pridelka z agarozno gelsko elektroforezo.....	15
3.1.6	Laboratorijska oprema	16
3.2	METODE DELA	17
3.2.1	Priprava in shranjevanje kliničnih vzorcev	17
3.2.2	Dokazovanje astrovirusnih antigenov s testnim kompletom ProSpecT (Oxoid) (encimskoimunski kvalitativni test)	17
3.2.3	Osamitev RNA z iPrep Virus komercialnim kompletom (Invitrogen).....	18
3.2.4	Izvedba RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom AgPath-ID™ (Ambion)	19
3.2.4.1	Delna optimizacija metode RT-PCR v realnem času	19
3.2.4.1.1	Določanje koncentracije začetnih oligonukleotidov	19
3.2.4.1.2	Učinkovitost reakcije (E) pomnoževanja DNA	19
3.2.4.1.3	Vpliv reakcijskega volumna na uspešnost reakcije.....	20
3.2.4.1.4	Vpliv predhodne denaturacije RNA na uspešnost reakcije	20
3.2.4.1.5	Vpliv vključene interne kontrole luc-RNA	21
3.2.4.2	Dokazovanje HAstV RNA v kliničnih vzorcih	21
3.2.5	Analiza PCR pridelka z agarozno gelsko elektroforezo	22
3.2.6	Občutljivost in specifičnost encimskoimunskega testa (ELISA).....	23
4	REZULTATI.....	24
4.1	DELNA OPTIMIZACIJA METODE RT-PCR V REALNEM ČASU.....	24
4.1.1	Določanje koncentracije začetnih oligonukleotidov	24
4.1.2	Učinkovitost reakcije (E) pomnoževanja DNA.....	24
4.1.3	Vpliv reakcijskega volumna na uspešnost reakcije.....	25
4.1.4	Vpliv predhodne denaturacije RNA na uspešnost reakcije.....	25
4.1.5	Vpliv vključene interne kontrole luc-RNA.....	25
4.2	ZNAČILNOSTI VZORCEV	27

4.3	DOKAZOVANJE HASTV RNA V VZORCIH S PREDHODNO DOKAZANIM ANTIGENOM HASTV Z ENCIMSKOIMUNSKIM TESTOM	28
4.4	ZNAČILNOSTI NEGATIVNIH VZORCEV POTRJENIH Z ENCIMSKO IMUNSKIM TESTOM (ELISA) V OBDOBJU OD JANUARJA 2008 DO JANUARJA 2010	33
4.5	OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST ENCIMSKOIMUNSKEGA TESTA (ELISA)	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	35
5.1	RAZPRAVA.....	35
5.1.1	Delna optimizacija metode RT-PCR v realnem času za dokazovanje astrovirusne RNA	36
5.1.2	Značilnosti pozitivnih in negativnih vzorcev potrjenih z encimskoimunskim testom (ELISA)	38
5.1.3	Občutljivost in specifičnost encimskoimunskega testa (ELISA) ProSpecT	40
5.2	SKLEPI.....	42
6	POVZETEK.....	43
7	VIRI	44

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Potek RT-PCR v realnem času	22
Preglednica 2: Rezultati vzorcev z dokazanimi astrovirusnimi antigeni, ki so testirani z RT-PCR v realnem času v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010.....	28
Preglednica 3: Rezultati vzorcev pregledanih z encimskoimunskim testom in RT-PCR v realnem času v obdobju od novembra 2008 do januarja 2009	34
Preglednica 4: Občutljivost in specifičnost encimskoimunskega testa (ELISA)	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Genom astrovirusov (Willcocks in sod., 1992).....	6
Slika 2: Princip encimskoimunskega testa (Cell Signaling Technology, 2010).....	10
Slika 3: Stopnje krivulje pomnoževanja nukleinske kisline z RT-PCR v realnem času (VanGuilder in sod., 2008).....	13
Slika 4: Primerjava reakcij z različnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov	24
Slika 5: Učinkovitost pomnoževanja HAstV RNA	26
Slika 6: Učinkovitost pomnoževanja HAstV RNA s hkratnim pomnoževanjem interne kontrolne (luc-RNA)	26
Slika 7: Rezultati testiranja vzorcev z RT-PCR v realnem času, ki smo jih predhodno obdelali s testom ELISA.....	27
Slika 8: Število obolelih z astrovirusno okužbo glede na starost v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010	28
Slika 9: Porazdeljenost RT-PCR pozitivnih vzorcev	31
Slika 10: Porazdeljenost RT-PCR negativnih vzorcev.....	32
Slika 11: Prikaz odvisnosti OD od C_T za vzorce z dokazano HAstV RNA v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010	32
Slika 12: Rezultati ELISA negativnih vzorcev za HAstV antigen, pregledanih z RT-PCR v realnem času v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010	33

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ag	- antigen
BHQ	- black hole quencher
cDNA	- komplementarna DNA (ang.: complementary DNA)
C _T	- cikel praga detekcije (ang.: cycle threshold)
Da	- Dalton
ddH ₂ O	- demineralizirana destilirana voda
ELISA	- encimsko imunski test (ang.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
HAsV	- človeški astrovirusi
EDTA	- etilendiaminotetraacetna kislina
EM	- elektronska mikroskopija
M	- mejna vrednost
NTR	- nekodirajoča regija (ang.: non-translated regions)
ORF	- odprt bralni okvir (ang.: open reading frame)
PCR	- verižna reakcija s polimerazo (ang.: Polymerase Chain Reaction)
RNA	- ribonukleinska kislina (ang.: Ribonucleic acid)
RT-PCR	- verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (ang.: reverse transcription polymerase chain reaction)
TAE	- raztopina Trisa, acetata in EDTA
TMB	- tetrametilbenzidin

1 UVOD

Izbruhi virusnega gastroenteritisa so v nerazvitem svetu eni izmed vodilnih vzrokov umrljivosti med otroki starimi do 5 let. Glavni povzročitelji virusnega gastroenteritisa pri človeku so rotavirusi skupine A, enteritični adenovirusi, kalicivirusi in astrovirusi (Sdiri-Loulizi in sod., 2009; Blacklow in Herrmann, 1995).

Predstavnike družine *Astroviridae*, so prvič dokazali v iztrebkih dojenčkov z gastroenteritisom na podlagi značilne pet- ali šestkrake zvezdaste morfološke oblike vidne v presevnem elektronskem mikroskopu (Appleton in Higgins, 1975). Ikozaedrični virusi imajo pozitivno usmerjeno enojnovijačno RNA in so brez ovojnice. Do sedaj so določili osem serotipov človeških astrovirusov, med katerimi je najpogostejši serotip 1 (Jiang in sod., 1993; Brown in sod., 2008).

Človeški astrovirusi (HAstV) se pojavljajo tako v sporadičnih primerih kot v posameznih izbruhih. Opisali so jih tudi kot povzročitelje bolnišničnih okužb (Sdiri-Loulizi in sod., 2009). Povzročajo akutni gastroenteritis pri otrocih, starejših in imunsko oslabljenih posameznikih. Bolezen navadno traja od enega do štiri dni. Drisko običajno spremljajo različni bolezenski znaki, kot so bruhanje, povišana telesna temperatura, trebušni krči, dehidracija itd.. Okužbe so pogostejše v zimskih mesecih. Pogostost okužb z HAstV niha med 2 % in 17 % (Zhang in sod., 2006). Virus se prenašajo fekalno-oralno ter z onesnaženo vodo in hrano. Viruse so med drugim dokazali tudi v iztrebkih številnih živali (Brown in sod., 2008; Jakab in sod., 2004).

Astroviruse so pred odkritjem nukleotidnega zaporedja kompletnega genoma dokazovali z metodami neposredne elektronske mikroskopije (EM) in encimskoimunskimi testi (ELISA). Kasneje pa so se z razvojem specifičnih začetnih oligonukleotidov začele uveljavljati visoko občutljive in hitre molekularne metode, kot je verižna reakcija s polimerazo (PCR). V zadnjem času je še posebej aktualna njena različica, to je verižna reakcija s polimerazo v realnem času s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR v realnem času). Zaradi visokih stroškov se kljub razvoju novejših in občutljivejših metod v

diagnostiki astrovirusov še vedno uporabljajo nizko občutljivi encimskoimunski testi (Royuela in sod., 2006; Finkbeiner in sod., 2008).

Z izboljšavo diagnostičnih in tipizacijskih metod se povečuje tako incidenca kot obseg genetske spremenljivosti HAstV. Če bi želeli razjasniti podcenjenost bremena okužb s HAstV, bi morali uporabljati novo razvite metode v obsežnih epidemioloških raziskavah. Prav tako bi morali za razumevanje bolezni, povzročene s HAstV, natančno preučiti organizacijo genoma ter molekularne mehanizme patogenosti. Slednje bi nam pomagalo pri ugotavljanju morebitnih tarčnih mest za delovanje protivirusnih zdravil (Guix in sod., 2005).

1.1 NAMEN DELA

Diplomsko nalogo smo opravili z namenom, da preverimo primernost do sedaj uveljavljenih metod (EM, ELISA) za dokazovanje sporadičnih astrovirusnih okužb. Slednje metode kažejo namreč nizko občutljivost. Iz tega razloga smo uvedli in optimizirali občutljivejšo diagnostično metodo RT-PCR v realnem času.

Naredili smo primerjavo metode za dokazovanje astrovirusnih antigenov (ELISA) z RT-PCR v realnem času. Hkrati smo določili še občutljivost in specifičnost encimskoimunske metode.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Leta 1975 sta Appleton in Higgins pri raziskovanju povzročitelja izbruha gastroenteritisa v porodnišnici na jugu Anglije odkrila viruse, ki so jih nekaj let kasneje, ko so na tržišču postali dostopni specifični imunski reagenti, prepoznali kot astroviruse (Cubitt in sod., 1999). Nekaj mesecev kasneje sta Madeley in Cosgrove z elektronsko mikroskopijo prvič opisala in poimenovala človeške astroviruse z značilno zvezdasto morfologijo v vzorcih iztrebkov dojenčkov z gastroenteritisom. Astroviruse sta opisala kot male okrogle viruse z značilno pet- ali šestkrako zvezdasto strukturo (Royuela in sod., 2006). Izbruhe in sporadične primere HAstV so zabeležili v vseh starostnih skupinah, najpogosteje pri otrocih (Cubitt in sod., 1999). Astroviruse so določili tako pri človeku kot pri mačkah, prašičih, ovcah, pticah in perutnini (Zhang in sod., 2006).

Na podlagi strukture genoma so astroviruse (Jiang in sod., 1993; Monroe in sod., 1993; Lewis in sod., 1994) razvrstili v novo družino RNA virusov brez ovojnice *Astroviridae* (Risco in sod., 1995).

V raziskavah (Madeley, 1979; Oliver in Phillips, 1988) so pogosto poročali, da le manjšina virusnih delcev kaže značilno morfologijo. V prvotnem opisu astrovirusov sta Madeley in Cosgrove (1975) poročala, da je takšnih astrovirusov kar 90 %. Ker so se pojavili dvomi o zgradbi virusa, so proučili ultrastrukturo astrovirusov in opisali ikozaedrično kapsido, ki ima različne površinske konice (Risco in sod., 1995).

HAstV so razširjeni po vsem svetu, čeprav je njihova pojavnost zaradi pomanjkanja občutljivosti diagnostičnih testov precej podcenjena. Leta 1981 sta Lee in Kurtz prvič poročala o osamitvi in razmnoževanju človeških astrovirusov v primarnih celičnih kulturah. Slednje je pripomoglo, da so 3 leta kasneje (Kurtz in Lee, 1984) opisali že 5 serotipov, v naslednjih 10 letih pa so odkrili še 2 serotipa (Risco in sod., 1995). Leta 2002 so verjetno zaradi občutljivejših testov ali prve pojavnosti virusa, odkrili zadnji do sedaj znani serotip pri ljudeh, astrovirus 8 (Jääskeläinen in Maunula, 2006).

Astroviruse so v iztrebkih dokazovali 15 let le z elektronsko mikroskopijo, dokler niso leta 1990 razvili encimskoimunskega testa, ki temelji na principu specifičnih monoklonskih

protiteles usmerjenih proti virusnim antigenom. Šele z razvojem te metode, so začeli astrovirusom pripisovati večji pomen v medicini (Blacklow in Herrmann, 1995).

Odkritje celotnega genoma človeških astrovirusov (Willcocks in sod., 1994) je pripomogla k razvoju molekularnih diagnostičnih orodij. Med spremljanjem izbruha gastroenteritisa na pediatričnem oddelku bolnišnice leta 1995, so Mitchell in sod. (1995) zaznali nizko občutljivost encimskoimunskega testa, s katerim so dokazovali astroviruse. Posledično so vpeljali občutljivejšo molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo RT-PCR (Cubitt in sod., 1999).

2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Astroviruse so osamili tako pri človeku kot pri številnih živalskih vrstah (Finkbeiner in sod. 2008). Zaradi podobnosti so jih sprva želeli uvrstiti med viruse iz družin *Picornaviridae* ter *Caliciviridae*. Virusi so namreč goli ikozaedrični in imajo linearno pozitivno usmerjeno enojnovijačno RNA. Po preučitvi kapsidnih proteinov so jih razvrstili v ločeno družino *Astroviridae* (Monroe in sod., 1993).

Glede na izvor in strukturo genoma so družino *Astroviridae* razdelili na rodova:

- *Mamastrovirus*,
- *Avastrovirus* (Guix in sod., 2005).

V rod *Mamastrovirus* uvrščamo vseh osem serotipov človeških astrovirusov ter serotipe ostalih sesalcev:

- goveji astrovirusi,
- mačji astrovirusi,
- ovčji astrovirusi,
- prašičji astrovirusi,
- astrovirusi kun.

Za razliko od sesalčjega rodu, pa rod *Avastrovirus* vključuje samo ptičje astroviruse:

- račji astrovirusi,
- piščančji astrovirusi,

- puranji astrovirusi (ICTV, 2009; Knipe in Howley, 2007; Finkbeiner in sod., 2008).

Na podlagi virusne reaktivnosti s poliklonskimi protitelesi ter nukleotidne spremenljivosti 5` ali 3` konca odprtega bralnega okvirja (iz ang. ORF: Open reading frame), so filogenetsko razvrstili vseh osem človeških astrovirusnih serotipov (HAstV 1-8). V raziskavi opravljeni v Mehiki so ugotovili, da je v obdobju 6 mesecev v populaciji hkrati krožilo kar šest serotipov HAstV (1 do 4, 6 in 8). Najpogosteje se je pojavljal serotip 1, kar je skladno z ugotovitvami ostalih raziskav (Guix in sod., 2002; Jakab in sod., 2003; Liu in sod., 2007) iz različnih geografskih območij. Najredkeje se pojavlja serotip 8, saj so dokazali le tri dodatne seve serotipa 8 in sicer v Avstraliji, Ugandi ter Gazi (Méndez-Toss in sod., 2000; Guix in sod., 2005).

2.3 STRUKTURA VIRUSA

Astrovirusi imajo linearno pozitivno usmerjeno enojnovijačno RNA, ki je obdana z ikozaedrično kapsido, sestavljeno iz treh proteinov (Finkbeiner in sod., 2008). Virusne beljakovine nastanejo po proteolitski cepitvi primarne beljakovine, ki nastane pri prevajanju ORF2. V premeru merijo 28 do 30 nm. Virusni delci imajo na površini gladke robove in značilno pet do šestkrako zvezdasto strukturo (Willcocks in sod., 1994).

Dolžina poliadeniliranega genoma je približno 6 do 8 kb. Genom sestavljajo tako 5` kot 3` nekodirajoče regije (NTRs), poli A rep ter trije odprti bralni okvirji (slika 1). Slednji so razvrščeni v smeri 5` proti 3` po sledečem zaporedju:

- ORF1a
- ORF1b
- ORF2

ORF1a in ORF1b kodirata nestrukturane proteine, ki sodelujejo pri transkripciji in replikaciji. ORF1a kodira serinsko proteazo ter vsebuje motive jedrnega signala, ORF1b pa od RNA odvisno RNA polimerazo. ORF2 (2,4 kb) kodira strukturne virusne polipeptide. Pozitivno usmerjena RNA astrovirusov je hkrati mRNA za ne-strukturne proteine in se prevede v dva poliproteina. Poliprotein dolg 920 aminokislin vključuje izključno ORF1a,

drug poliprotein dolg 513 aminokislin, pa vključuje tako ORF1a kot ORF1b. Poliproteina nastaneta po translacijskem premiku bralnega okvirja med tema dvema ORFs. Znano je, da se oba nestrukturna poliproteina cepita z virusno proteazo, ki je kodirana na ORF1. Strukturni beljakovini sta kodirani na ORF2, ki je vključen tudi v podgenomsko RNA. Leta se sintetizira med pomnoževanjem virusa. V končni fazi nastane poliprotein, velik 86-90 kDa, ki ga celična proteaza cepi v tri do pet polipeptidov (Méndez-Toss in sod., 2000; Finkbeiner in sod., 2008).



Slika 1: Genom astrovirusov (Willcocks in sod., 1992)

2.4 ASTROVIRUSNE OKUŽBE PRI LJUDEH

2.4.1 Patogeneza

Predstavniki družine *Astroviridae* povzročajo drisko in enteritis pri številnih sesalcih in ptičjih gostiteljih. Zelo malo je znanega o patogenezi ali gostiteljskih faktorjih, vključenih v okužbe z astrovirusi (Koci in sod., 2003). Po nedavnih histopatoloških raziskavah perzistentno okuženih imunsko oslabeledih otrok z gastroenteritisom, so ugotovili, da je astrovirusna okužba omejena na tanko črevo. Prizadeti so namreč enterociti tankega črevesa (Sebire in sod., 2004). Astrovirusi naj bi prav tako sprožili viremijo (Koci in sod., 2003).

Z raziskavami na celičnih kulturah (celice Graham-293) okuženimi s človeškimi astrovirusi, so pokazali, da virusi vstopajo v celice z endocitozo (Donelli in sod., 1992). Morfološke spremembe v črevesju nakazujejo, da vnetni odgovor ni primarno vključen v patogenezo virusa. V raziskavah pri okuženih puranih so celo dokazali, da virus lahko izzove drisko brez predhodnega histološkega vnetja in celične smrti (Sebire in sod., 2004).

2.4.2 Klinični znaki in zdravljenje

Človeški astrovirusi povzročajo gastroenteritis, ki primarno prizadene otroke po vsem svetu. Klinični znaki okužbe se razlikujejo glede na obolelo populacijo (Knipe in Howley, 2007). Inkubacijska doba je 1 do 4 dni. Pojavijo se značilni klinični znaki, kot so vodena driska, bolečine v trebuhu, bruhanje, povišana telesna temperatura ter drugi znaki, ki trajajo od 2 do največ 4 dni (Finkbeiner in sod., 2008). Smrtni primeri so zelo redki, čeprav so o tem v preteklosti že poročali (Singh in sod., 1989).

Astrovirusni gastroenteritis lahko primerjamo z blago obliko rotavirusnega enteritisa. S kohortno študijo v Egiptu (Naficy in sod., 2000), v katero so vključili otroke do 3 leta starosti, so ugotovili, da je obolevnost za gastroenteritisom s hudo dehidracijo, ki ga povzročajo astrovirusi ali rotavirusi, enaka. Okužbi z astrovirusi ali rotavirusi se klinično razlikujeta samo v tem, da je astrovirusna okužba blažja od rotavirusne okužbe in da dehidracija nastopi le v redkih primerih (Finkbeinerin sod., 2008).

Gastroenteritis je običajno blaga bolezen in mine sama od sebe, zato specifično zdravljenje ni potrebno. Kadar pri majhnih otrocih ali starejših bolnikih nastopi dehidracija, je navadno potrebna intravenozna podporna terapija, ki vključuje nadomeščanje tekočine in elektrolitov (Knipe in Howley, 2007).

2.4.3 Imunost

Simptomatsko astrovirusno okužbo praviloma zaznamo v dveh starostnih skupinah: pri majhnih otrocih in starejših ljudeh v raznih zdravstvenih ustanovah, bolnišnicah in domovih za starejše občane. Dokazali so, da specifična astrovirusna protitelesa, ki jih pridobimo v otroštvu, večji del življenja ščitijo pred okužbo (Knipe in Howley, 2007). Astrovirusna okužba pri ljudeh vseh starosti izzove protitelesni imunski odziv, pri čemer nastanejo za določen serotip specifična nevtralizacijska protitelesa (Koopmans in sod., 1998). Raziskave bioptičnih vzorcev črevesnega tkiva bolnikov nakazujejo, da je pri protivirusnem odgovoru vključen tudi celični imunski odziv, oz. specifični limfociti T pomočniki (celice CD4+). Aktivirane celice izločajo citokine T_H1, interferone gama in

tumor nekrozirajoče faktorje, ki tako sodelujejo pri uničevanju z virusi okuženih celic (Koci, 2005).

2.4.4 Epidemiologija

Astrovirusi se širijo fekalno-oralno, navadno neposredno z okuženega na zdravega človeka (Midthun in sod., 1993). Prav tako se prenašajo z aerosoli pri bruhanju in z okuženo vodo ter hrano (Knipe in Howley, 2007). Poznan je primer iz Japonske, kjer so izbruhe astrovirusnih okužb povezali z okuženo hrano pri šoloobveznih otrocih in pri odraslih (Oishi in sod., 1994). Endemično se pojavljajo po vsem svetu in povzročajo sorazmerno blago obliko gastroenteritisa. Okužbe se pojavljajo pri ljudeh vseh starosti, najpogosteje pri majhnih otrocih starih do dveh let in sicer skozi vse leto, pogosteje pa v zimskih mesecih (Finkbeiner in sod., 2009). Večina otrok razvije zaščitna protitelesa do 6. leta starosti. Veliko okužb je brez izraženih kliničnih znakov, 5-9 % gastroenteritisov pri otrocih pa lahko zagotovo pripišemo astrovirusom (Monroe in sod., 2001). Izbruhi se najpogosteje pojavijo v zaprtih skupnostih, kot so šole, vrtci, otroški oddelki bolnišnic, domovi za ostarele itd.. Večina otrok nad 6 let in odraslih je imunih, kljub temu pa so sporadične izbruhe opazili pri imunsko oslabelih in starejših bolnikih v bolnišnicah ter domovih za ostarele (Willcocks in sod., 1992; Marshall in sod., 2007).

Najpogostejši povzročitelji astrovirusnih okužb pri otrocih so astrovirusi serotipa 1 (Liu in sod., 2007). Prevladujoč serotip je sicer odvisen od letnega časa in geografskega območja (Knipe in Howley, 2007).

Okužbe z astrovirusi pri obolelih za gastroenteritisom v Sloveniji ugotavljajo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov. Astroviruse dokazujejo z EM ter encimskoimunskim testom ELISA. Zaključki raziskave v prvi polovici leta 2004, kjer so HAstV dokazovali v iztrebkih bolnikov, obolelih za gastroenteritisom z molekularno metodo RT-PCR so pokazali, da je delež okužb z astrovirusi znašal 1,1 %. Rezultati so primerljivi z deležem iz drugih evropskih raziskav (Fratnik, 2005).

2.5 DIAGNOSTIKA

2.5.1 Elektronska mikroskopija

Prvotno so astroviruse neposredno dokazovali v vzorcih iztrebkov bolnikov z metodami neposredne elektronske mikroskopije, s tehniko negativnega kontrastiranja. Občutljivost metode je nizka, saj je za diagnostiko potrebno 10^6 do 10^7 virusov na gram iztrebka (Glass in sod., 1996). Običajno je v iztrebkih zadostno število virusov saj bolniki z drisko izločajo velike količine virusnih delcev in sicer 10^{10} do 10^{11} na gram iztrebka. V nasprotnem primeru lahko viruse dokazujemo z imunsko elektronsko mikroskopijo, kjer uporabljamo virusno-specifična protitelesa. Ta se vežejo z virusnimi antigeni v grozdaste skupke, ki jih v preparatu lažje opazimo. Vendar je tudi ta metoda omejena, saj ni specifičnih protiteles za vse serotipe (Hazelton in Gelderblom, 2003; Marin, 2007).

Ena izmed glavnih pomanjkljivosti elektronske mikroskopije je tudi ta, da so za opazovanje astrovirusov z elektronskim mikroskopom potrebne številne izkušnje, saj običajno le 10 % astrovirusnih delcev v vzorcu kaže značilno zvezdasto morfologijo (Knipe in Howley, 2007).

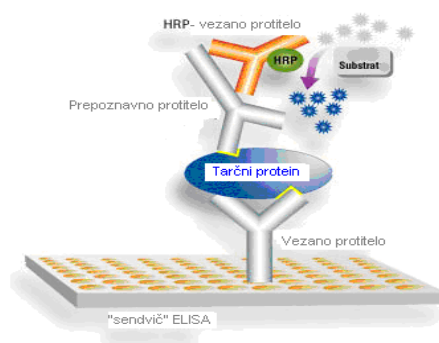
2.5.2 Dokazovanje virusnih antigenov

Astrovirusi so postali medicinsko pomembni šele po opravljenih obsežnih raziskavah na Tajskem leta 1991. Tega leta so namreč Herrmann in sod. dokazali astroviruse z novo razvito encimskoimunsko metodo (ELISA). Metoda temelji na osnovi zaznavanja virusnih antigenov z monoklonskimi protitelesi. V primerjavi z imunsko elektronsko mikroskopijo, ki so jo uporabili kot standardno metodo, je občutljivost testa ELISA znašala 91 %, specifičnost pa 96 %. S testom lahko danes dokažemo vseh 8 znanih serotipov (Brown in sod., 2008; Herrmann in sod., 1990).

Metodo so nato izboljšali z uporabo sekundarnih protiteles, označenih z biotinom (Moe in sod., 1991). Razvili so tudi encimskoimunsko metodo za tipizacijo človeških astrovirusov (Noel in sod., 1995). Z razvojem encimskoimunskih metod so lahko obsežneje testirali iztrebke bolnikov in ugotavljali epidemiološke značilnosti astrovirusnih okužb (Moe in sod., 1991).

Izmed številnih komercialno dostopnih encimskoimunskih testov za dokazovanje virusov, najpogosteje uporabljamo sistem dvojnih protiteles (slika 2). Test vsebuje trdno fazo, ki je navadno mikrotitrna ploščica z vezanimi protitelesi proti iskanemu virusu. Po dodatku vzorca bolnika se morebitno prisotni antigeni vežejo s protitelesi v komplekse. Na komplekse se nato vežejo dodana sekundarna protitelesa, označena z encimom. Po inkubaciji dodamo substrat, ki po delovanju encima spremeni barvo. Spremembo barve lahko zaznamo že z opazovanjem, običajno pa z merjenjem optične gostote pri določeni valovni dolžini s spektrofotometrom (James, 1990; Marin, 2007).

Trenutno so na tržišču številni encimskoimunski testi v obliki komercialnih kompletov, ki so lahko dvomljive kakovosti. V primeru, da so testi slabo občutljivi ali specifični ali jih nepravilno uporabljamo, lahko storimo hudo diagnostično napako (Avšič Županc, 2007).



Slika 2: Princip encimskoimunskega testa (Cell Signaling Technology, 2010)

2.5.3 Molekularne metode

Z osamitvijo in postopnim spoznavanjem nukleotidnega zaporedja genoma človeških astrovirusov, se je začel razvoj molekularnih metod, ki med drugim vključujejo najbolj občutljivo in specifično metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Kasnejše odkritje začetnih oligonukleotidov, ki prilegajo na visoko ohranjeno regijo genoma HAstV, pa je omogočil razvoj enostopenjske verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR), kjer hkrati potekata tako prepisovanje kot pomnoževanje virusne RNA (Traoré in sod., 2000).

RT-PCR je edina metoda, s katero lahko pri spremljanju izbruhov dokazujemo okužbe brez izraženih kliničnih znakov. Občutljivost metode znaša od 10 do 100 delcev na gram iztrebka, odvisno od začetnih oligonukleotidov in specifičnih reakcijskih pogojev. RT-PCR je tako v primerjavi z drugimi virološkimi metodami najobčutljivejša metoda, saj je občutljivost EM 10^6 - 10^7 , pri metodi ELISA ter hibridizaciji po Northernu pa 10^5 - 10^6 delcev na gram iztrebka (Mustafa in sod., 1998). Sprva te metode v številnih raziskavah niso uporabljali pri testiranju velikega števila vzorcev, predvsem zaradi visoke cene in napornega dela. Prav tako lahko občutljivost metode drastično upade kadar so v vzorcu iztrebka nespecifični inhibitorji, ki ovirajo aktivnost encimov reverzne transkriptaze ali DNA polimeraze. Sicer inhibitorje navadno odstranimo že pri osamitvi nukleinske kisline (Mustafa in sod., 1998).

Klasični RT-PCR so nato nadgradili in razvili RT-PCR v realnem času, ki omogoča kvantifikacijo tarčnega nukleotidnega zaporedja.

RT-PCR v realnem času ima številne prednosti. Tehnika je hitra, občutljiva in ni potrebe po naknadnem rokovanju s PCR pridelki, kar močno zmanjša možnost kontaminacij (Royuela in sod., 2006).

RT-PCR v realnem času lahko izvedemo enostopenjsko ali dvostopenjsko. Pri enostopenjski reakciji v eni sami epruveti najprej poteče reverzna transkripcija, kjer se virusna RNA prepíše v cDNA nato pa sledi njeno pomnoževanje. V dvostopenjski reakciji oba postopka izvajamo ločeno. Prednost enostopenjske reakcije je zmanjšana stopnja kontaminacije ter ostalih napak, ki se pojavijo pri delu npr. pri pipetiranju. Reakcija je hitrejša in cenejša (Wacker in Godard, 2005).

Pri transkripciji z reverzno transkriptazo nastane hibrid RNA-cDNA, ki se nato z enakim encimom tudi razgradi. Le tako lahko DNA polimeraza prepíše cDNA v dvojnovijsko DNA. Sledi klasična PCR reakcija, ki je sestavljena iz :

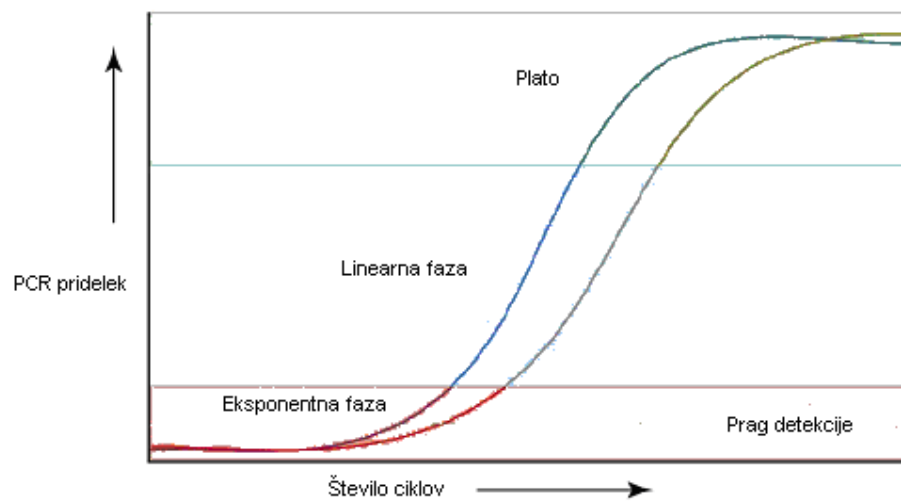
- denaturacije, kjer se dvojnovijska molekula razdvoji v dve enojnovijski pri temperaturi 90-95 °C,

- vezave začetnih oligonukleotidov na komplementarne dele tarčne DNA pri temperaturi 50-65 °C (odvisno od nukleotidnega zaporedja začetnih oligonukleotidov in sonde),
- podaljševanja začetnih oligonukleotidov pri 72 °C, kjer polimeraza v smeri od 5` proti 3` koncu sintetizira komplementarno verigo.

Novo nastali molekuli DNA sta med seboj komplementarni in v naslednjem ciklu vežeta enake začetne oligonukleotide. Navadno sledi 25 do 40 zaporednih ponovitev, kjer se eksponentno kopičijo pomnoženi deli DNA. Sledenje kopičenja pridelkov pri PCR v realnem času nam omogočajo z barvili označene sonde s specifičnim zaporedjem, ali interkalirajoča fluorescentna barvila, ki jih dodamo v začetno reakcijsko mešanico. Najpogosteje se uporabljajo hidrolizirajoče sonde TaqMan.

Sonde TaqMan so označene z dvema molekulama imenovanima fluorescenčni poročevalec in dušilec. Fluorescenčno barvilo je običajno vezano na 5' konec sonde, dušilec pa na 3' konec sonde. Pogosto uporabljen poročevalec je FAM (6-carboxyfluorescein). Poznamo fluorescirajoče (npr. TAMRA: Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine) in nefluorescirajoče (npr. BHQ) dušilce. Sonda se veže na komplementarno zaporedje DNA med oba začetna oligonukleotida. Polimeraza *Taq* med podaljševanjem verige s 5'-3' eksonukleazno aktivnostjo cepi vezano sondo. S tem ko se sonda razcepi, poročevalec in dušilec nista več povezana, kar omogoča oddajanje fluorescence specifične valovne dolžine. Intenziteta nastale fluorescence je sorazmerna količini pridelka PCR (VanGuilder in sod., 2008).

Rezultate analiziramo s programom, ki podatke izpiše v obliki krivulj in vrednosti C_T in jim lahko sledimo sproti na zaslonu v realnem času (slika 3). Sprva, kadar imamo na razpolago dovolj encima in reagentov ter majhno količino pridelkov PCR, začne krivulja rasti eksponentno. V začetku eksponentne rasti lahko določimo vrednost C_T (iz ang. Cycle of threshold), ki predstavlja cikel, kjer fluorescence nastalega produkta preseže fluorescenco ozadja in prečka linijo fluorescenčnega praga. S kopičenjem produktov sledi linearna faza, ki se zaključi s platojem, kjer učinkovitost reakcije pada zaradi pomanjkanja reagentov (VanGuilder in sod., 2008).



Slika 3: Stopnje krivulje pomnoževanja nukleinske kisline z RT-PCR v realnem času (VanGuilder in sod., 2008)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Klinični vzorci

V diplomski nalogi smo testirali iztrebke bolnikov, ki so jih poslali v laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani zaradi suma na gastroenterično okužbo. V obdobju od januarja 2008 do januarja 2010 smo zbrali 341 vzorcev. Pri 97 so predhodno z encimskoimunskim testom določili astroviruse. Od skupno 341 vzorcev smo samo v obdobju od novembra 2008 do januarja 2009 zajeli 208 vzorcev, pri katerih astrovirusnih antigenov z encimskoimunskim testom niso dokazali in 10 vzorcev s prisotnimi astrovirusnimi antigeni.

3.1.2 Materiali in reagenti za encimskoimunski test ProSpecT (Oxoid)

- vdolbinica z vezanimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti astrovirusnim antigenom
- konjugat monoklonskih protiteles in encima
- pozitivna kontrola
- negativna kontrola (razredčitveni pufer za vzorce)
- substrat TMB
- reagent za ustavitev reakcije
- spiralni pufer

3.1.3 Komercialni komplet za osamitev virusne RNA z iPrep PureLink Virus kompletom (Invitrogen)

- kartuše z reagenti

- 2 ml epruvice
- elucijske 1,5 ml epruvice
- nastavki in držala za nastavke

3.1.4 Reagenti za reakcijo RT-PCR v realnem času s kitom AgPath-ID™ (Ambion)

- sterilna voda brez nukleazne aktivnosti (Ambion)
- pufer (Ambion)
- encimska mešanica (Ambion)
- začetni oligonukleotidi (Svraka in sod., 2009):
 - pozitivno usmerjen AC'1-F: 5'-ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG-3'
 - negativno usmerjen AC230-R: 3'-GGTTTTGGTCCTGTGACACC-5'
 - sonda AC LCpr : 5'-FAM-CAACGTGTCGTAAMATTGTCA-BHQ-3'
- pozitivna kontrola (s predhodno analizo nukleotidnega zaporedja potrjen sev HAstV)
- negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

3.1.5 Material za analizo PCR pridelka z agarozno gelsko elektroforezo

- Agaroz (Promega)
- 1x TAE puferska raztopina (razredčena iz 50x TAE):
 - Tris baza (242,0 g)
 - Ocetna kislina(57,0 g)
 - EDTA (37,2 g)
- etidijev bromid (5 mg/ml)
- 6x nanašalni pufer
- molekularni označevalec (Fermentas)

3.1.6 Laboratorijska oprema

- plastične epruvete (10 ml, 1,5 ml Eppendorf)
- stojalo za epruvete
- plastične epruvete (Eppendorf)
- avtomatske pipete (območja pipetiranja 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l) (Eppendorf)
- nastavki s filtri za avtomatske pipete (Eppendorf)
- merilni valj
- erlenmajerice
- kadička za elektroforezo (Biometra)
- komori za varno delo (Iskra PIO, LFV 9)
- namizna centrifuga (Eppendorf 5415R)
- vibracijsko mešalo (Biosan, Bio vortex V1)
- spektrofotometer (Humareader)
- mikrovalovna pečica (MWG 729, Clatronic)
- napajalnik za elektroforezo (LKB Bromma)
- spiralni aparat (Thermo Scientific)
- aparat iPrep za osamitev virusne RNA (Invitrogen)
- aparat StepOne™ System (Applied biosystems) za izvedbo RT-PCR v realnem času
- zaščitne rokavice brez smukca (Safeskin)
- staničevina
- zbiralnik za odpadke

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava in shranjevanje kliničnih vzorcev

Najmanj 30-50 mg vzorca iztrebka ali izbruhanine smo resuspendirali v fosfatnem pufru ter centrifugirali 5 min pri 1600x g. Supernatante smo nato hranili v hladilniku pri + 4 °C ali zamrznili pri -20 °C do nadaljnje obdelave.

3.2.2 Dokazovanje astrovirusnih antigenov s testnim kompletom ProSpecT (Oxoid) (encimskoimunski kvalitativni test)

Ploščico z vdolbinicami, z vezanimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti astrovirusnim antigenom (HAstV Ag), za določeno število vzorcev in kontrol smo vstavili v nosilec. V označene vdolbinice, katerih lego smo označili na protokolnem delovnem listu, smo odpipetirali 100 µl (2 kaplji) razredčenih vzorcev, pozitivno ter negativno kontrolo (razredčitveni pufer). V vsako vdolbinico smo dodali še 2 kaplji encimskega konjugata, rahlo pretresli, pokrili s folijo in inkubirali 60 min pri sobni temperaturi. Po inkubaciji je sledilo 5x spiranje vdolbinic s sveže pripravljanim spiralnim pufrom. Ko smo s spiralnim aparatom odstranili ves spiralni pufer, smo dodali v vsako vdolbinico 2 kaplji substrata, pokrili s folijo in ponovno inkubirali pri sobni temperaturi, tokrat za 10 min. Nato smo dodali 2 kaplji raztopine za ustavitev reakcije in izvedli spektrofotometrično meritev. Optično gostoto smo merili pri valovni dolžini 450 nm. Pri vrednotenju tako pridobljenih rezultatov smo upoštevali s strani proizvajalca določene kriterije:

- HAstV antigen smo dokazali, če je bila optična gostota višja od mejne vrednosti (cut-off).
- HAstV antigena nismo dokazali, če je bila optična gostota nižja od mejne vrednosti.
- Izmerjena optična gostota pozitivne kontrole je morala biti višja od 0,5, negativne pa nižja od 0,150.

Mejno vrednost smo izračunali tako, da smo izmerjeni optični gostoti negativne kontrole prišteli vrednost 0,1.

3.2.3 Osamitev RNA z iPrep Virus komercialnim kompletom (Invitrogen)

Supernatant razredčenih kliničnih vzorcev smo v primeru shranjevanja pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ odmrznili pri sobni temperaturi. V 1,5 ml avtoklavirane epruvetke smo nato odpipetirali 230 μl vzorca ter centrifugirali 5 min pri maksimalni hitrosti (16000x g). Med tem časom smo vklopili aparat in prestavili stojali za epruvetke in kartuše v brezprašno komoro. V stojalo za kartuše smo vstavili za vsak vzorec po eno kartušo ter ga postavili nazaj v aparat. V luknjico zadnjega dela kartuše smo vstavili 2 ml epruvetke z interno kontrolo (5 pg luc-RNA) brez pokrovčka. Stojalo za epruvetke smo napolnili po navodilu programa proizvajalca aparata:

- V prvo vrsto označena z E smo vstavili elucijske 1,5 ml epruvetke, katere pokrovčke z označeno številko vzorca smo postavili v vdolbinico ob vsaki epruvetki na stojalu.
- V tretjo vrsto označeno s S smo vstavili 1,5 ml epruvetke z 205 μl supernatana, ki smo ga predhodno odpipetirali iz centrifugiranega vzorca, brez pokrovčka.

Nato smo vključili program in sledili zahtevanim korakom protokola. RNA smo osamili iz 200 μl vzorca in jo eluirali v 100 μl sterilne vode, proste nukleaz. Po končanem avtomatiziranem protokolu smo elucijske epruvetke z osamljeno RNA shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter odstranili uporabljene kartuše, nastavke in epruvetke.

3.2.4 Izvedba RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom AgPath-ID™ (Ambion)

3.2.4.1 Delna optimizacija metode RT-PCR v realnem času

3.2.4.1.1 Določanje koncentracije začetnih oligonukleotidov

Za enostopenjsko reakcijo RT-PCR smo najprej pripravili reakcijske mešanice, ki so se razlikovale le v koncentracijah začetnih oligonukleotidov. V ločenih reakcijskih mešanicah smo uporabili različne koncentracije začetnih oligonukleotidov: 500 nM, 750 nM in 900 nM. Nato smo po opisanem postopku odpipetirali 23 μ l različnih RT-PCR mešanic v PCR epruvetke in dodali 2 μ l RNA vzorca ter ustrezno pozitivno in negativno kontrolo.

Reakcijsko mešanico smo pripravili po naslednjem postopku:

- 12,5 μ l reakcijskega pufru
- pozitivno (AC1, 10 μ M) ter negativno usmerjena (AC-230, 10 μ M) začetna oligonukleotida (volumen v reakcijski mešanici je bil odvisen od testirane koncentracije (1,25 μ l, 1,875 μ l, 2,25 μ l))
- 0,625 μ l sonde (10 μ M) z vezanim fluoroforom FAM in nefluorescenčnim dušilcem BHQ
- 1,00 μ l encimske mešanice
- voda brez nukleazne aktivnosti (dodan volumen do skupnih 23 μ l)

Reakcijo smo izvedli z 10-, 100- in 1000-krat redčeno reakcijsko mešanico. Po končani reakciji smo analizirali vpliv različnih koncentracij začetnih oligonukleotidov na učinkovitost reakcije.

3.2.4.1.2 Učinkovitost reakcije (E) pomnoževanja DNA

Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA smo ugotavljali tako, da smo z RT-PCR v realnem času testirali 10-kratne redčitve osamljene RNA. V reakciji smo uporabili redčeno (10^1 - 10^7) osamljeno RNA pozitivne kontrole, testirano v dveh ponovitvah istega protokola.

Učinkovitost reakcije smo izračunali iz podatka naklona (k) linearne regresijske premice po naslednji enačbi (Rutledge in sod., 2003):

$$E = 10^{(-1/k)} - 1 \quad \dots (1)$$

3.2.4.1.3 Vpliv reakcijskega volumna na uspešnost reakcije

Za enostopenjsko reakcijo RT-PCR v realnem času smo pripravili RT-PCR mešanici celokupnega volumna 25 μM in 10 μM . Slednja vsebuje določene količine reagentov opisane v metodi 3.2.4.2. Reagente za mešanico celokupnega volumna 25 μM smo pripravili po opisu v komercialnem kompletu AgPath (Ambion):

- 6,357 μl vode brez nukleazne aktivnosti
- 12,5 μl reakcijskega pufra
- 1,25 μl pozitivnega (AC1, 10 μM) ter negativnega (AC-230, 10 μM) začetnega oligonukleotida
- 0,625 μl sonde (10 μM) z vezanim fluoroforom FAM in nefluorescenčnim dušilcem BHQ (iz angl.: Black Hole Quencher)
- 1 μl encimske mešanice

Po dodatku RNA vzorcev, smo pripravili redčitve (10^1 - 10^6) in jih v treh ponovitvah nanесли v PCR epruветke. Po reakciji RT-PCR v realnem času smo analizirali vpliv volumna na uspešnost reakcije.

3.2.4.1.4 Vpliv predhodne denaturacije RNA na uspešnost reakcije

Redčine (10^1 - 10^6) virusne RNA smo testirali v dveh ponovitvah. Prvič smo vzorce denaturirali v termopomnoževalniku 5 min pri temperaturi 90°C, med tem ko v drugem primeru redčeno RNA predhodno nismo denaturirali. Nato smo izvedli reakcijo RT-PCR v realnem času, ki nam je omogočil analizo vpliva denaturacije na uspešnost reakcije.

3.2.4.1.5 Vpliv vključene interne kontrole luc-RNA

Za ugotavljanje uspešnosti osamitve RNA in inhibitornih lastnosti osamljene RNA smo iste vzorce osamljene RNA testirali s pomnoževanjem luc-RNA, ki smo jo v vzorce dodali pri osamitvi RNA. Hkrati smo pomnoževali tako tarčno cDNA kot cDNA interne kontrole ter tako ugotavljali vpliv na učinkovitost reakcije in mejo detekcije. Izvedba pomnoževanja kontrolne RNA se razlikuje le v sondi, začetnih oligonukleotidih ter njihovem volumnu:

- 0,500 µl začetnega oligonukleotida LucF in LucR (10 µl),
- 0,250 µl sonde (10 µM) z vezanim fluoroforom YY (iz angl.: Yakima Yellow) in nefluorescentnim dušilcem BHQ (iz angl.: Black Hole Quencher)

3.2.4.2 Dokazovanje HAstV RNA v kliničnih vzorcih

Pomnoževanje virusne RNA smo izvedli tako, da smo najprej v 1,5 ml epruvetko pripravili mešanico za enostopenjsko reakcijo RT-PCR. Le ta je vsebovala določene količine sterilne vode, pozitivno ter negativno usmerjena začetna oligonukleotida, sonde, reakcijskega pufra ter encimske mešanice, preračunane iz sheme za en vzorec (celokupni volumen 10 µl):

- 0,85 µl vode brez nukleazne aktivnosti
- 5,00 µl reakcijskega pufra
- 0,75 µl pozitivno (AC1, 10 µM) ter negativno usmerjenega (AC-230, 10 µM) začetnega oligonukleotida
- 0,25 µl sonde (10 µM) z vezanim fluoroforom FAM in nefluorescenčnim dušilcem BHQ
- 0,40 µl encimske mešanice

V 0,2 ml PCR epruvetke, ki smo jih namestili v ledeni blok, smo odpipetirali 8 µl mešanice RT-PCR. Epruvetke smo nato prenesli v brezprašno komoro, kjer smo dodali 2 µl predhodno osamljene RNA vzorcev in negativno (voda brez nukleaze) ter pozitivno

kontrolno (laboratorijsko potrjen pozitiven vzorec). Epruvetke smo pokrili s pokrovčki, centrifugirali 30 s pri 1600x g in vstavili v aparat StepOne™ System. Virusno RNA smo nato pomnoževali po programu opisanem v preglednici 1.

Preglednica 1: Potek RT-PCR v realnem času

	Reverzna transkripcija	Prekinitev delovanja reverzne transkriptaze in aktivacija polimeraze	Denaturacija	Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige
Temperatura (°C)	45	95	95	56
Čas	10'	10'	15"	45"
Št. ciklov	1	1	45	

Po končanem postopku pomnoževanja smo v programu StepOne™ Systems software odčitali ter analizirali rezultate.

3.2.5 Analiza PCR pridelka z agarozno gelsko elektroforezo

Za analizo PCR pridelkov z agarozno gelsko elektroforezo smo najprej iz 1g agaroze in 50 ml 1x TAE pufra pripravili agarozni gel. Le tega smo nato do vrelišča segrevali v mikrovalovni pečici. Ko smo raztopljen gel ohladili na približno 60°C, smo dodali 5 µl (5 mg/ml) etidijevega bromida, premešali in ga zlili v plastični nosilec, kjer se je gel strdil. Gel smo nato prenesli v elektroforezno kadičko z glavničkoma, ki smo jo predhodno napolnili z 1x TAE pufrom. Glavniček smo odstranili, v vdolbinice gela pa smo odpipetirali 10 µl mešanice, ki smo jo pripravili iz 10 µl vzorca ter 2 µl 6x nanašalnega barvila. V eno vdolbinico smo namesto mešanice nanесли 5 µl molekularnega označevalca DNA. Elektroforezno kadičko smo nato priklopili na napajalnik in pri konstantni napetosti 90 V pustili teči 60 min. Po končani elektroforezi, smo gel pregledali pod ultravijolično svetlobo.

3.2.6 Občutljivost in specifičnost encimskoimunskega testa (ELISA)

Testa ELISA in RT-PCR smo ovrednotili glede na občutljivost in specifičnost. Občutljivost je verjetnost, da bo rezultat resnično pozitivnega vzorca pozitiven. Specifičnost pa je merilo verjetnosti, da bo rezultat resnično negativnega vzorca negativen. Občutljivost in specifičnost smo izračunali po naslednjih enačbah:

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \times 100 \% \quad \dots (2)$$

$$\text{Specifičnost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100 \% \quad \dots (3)$$

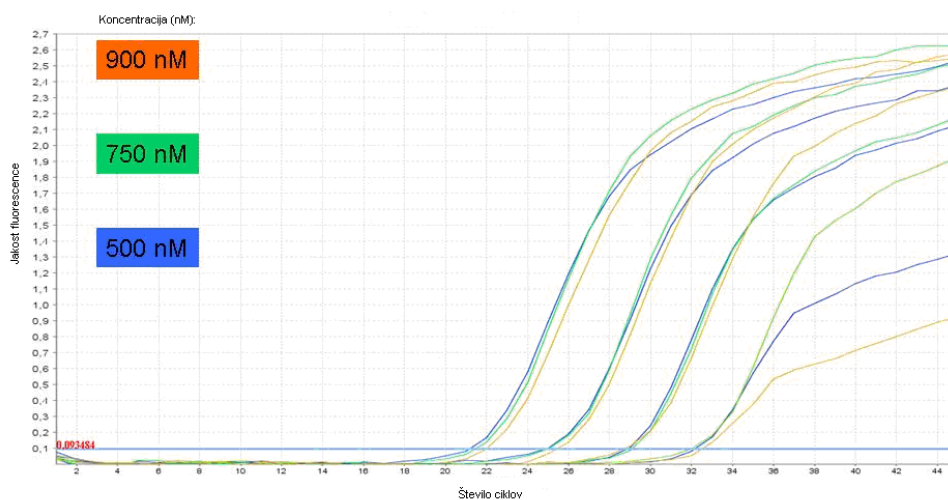
4 REZULTATI

4.1 DELNA OPTIMIZACIJA METODE RT-PCR V REALNEM ČASU

4.1.1 Določanje koncentracije začetnih oligonukleotidov

Učinkovitost reakcije pri različnih koncentracijah začetnih oligonukleotidov je prikazana na sliki 4. Najboljša učinkovitost reakcije (102 %) je bila pri koncentraciji 750 nM.

Namnožene tarčne odseke virusnega genoma (PCR-pridelke) pridobljene v reakcijah z različnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov, smo nanesti na gel, kjer smo ugotovili specifičnost PCR-pridelka ravno pri koncentraciji 750 nM (podatki niso prikazani).



Slika 4: Primerjava reakcij z različnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov

4.1.2 Učinkovitost reakcije (E) pomnoževanja DNA

Učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA, je po testiranju redčin osamljene RNA v dveh ponovitvah istega protokola, variirala med 90 % in 102 %.

Hkrati smo pri testiranju različnih redčitev in njihovih ponovitvah lahko določili tudi najvišjo vrednost cikla praga detekcije (C_T). Ocenili smo, da je najvišja vrednost za doseganje stabilnosti signala pomnoževanja C_T 36.

4.1.3 Vpliv reakcijskega volumna na uspešnost reakcije

Po zmanjšanju reakcijskega volumna iz 25 μM na 10 μM , nismo zaznali razlike v uspešnosti reakcije (podatki niso prikazani).

4.1.4 Vpliv predhodne denaturacije RNA na uspešnost reakcije

Po analizi rezultatov RT-PCR v realnem času, kjer smo testirali redčine virusne RNA v dveh ponovitvah, smo ugotovili, da je reakcija v primeru predhodne denaturacije manj uspešna kot reakcija brez predhodne denaturacije (podatki niso prikazani).

4.1.5 Vpliv vključene interne kontrole luc-RNA

Uspešnost pomnoževanja tarčne HAstV RNA v dveh serijah redčitev, pri čemer smo v drugo serijo dodali še hkrati interno kontrolo (lucRNA), je razvidna na slikah 5 in 6. Ugotovili smo, da hkratno pomnoževanje interne kontrole in tarčne HAstV RNA ne vpliva bistveno na uspešnost pomnoževanje HAstV RNA. V prvem primeru je bila namreč učinkovitost 90,7 %, ko smo tarčni HAstV RNA vključili še luc-RNA, pa 92,1 %. Hkrati smo opazili, da se v primeru vključene luc-RNA zmanjša občutljivost reakcije za vrednost 10x redčitve tarčne RNA (Sliki 5 in 6).

Izračun učinkovitosti pomnoževanja RNA (Rutledge in sod., 2003):

- brez hkratnega pomnoževanja interne kontrole

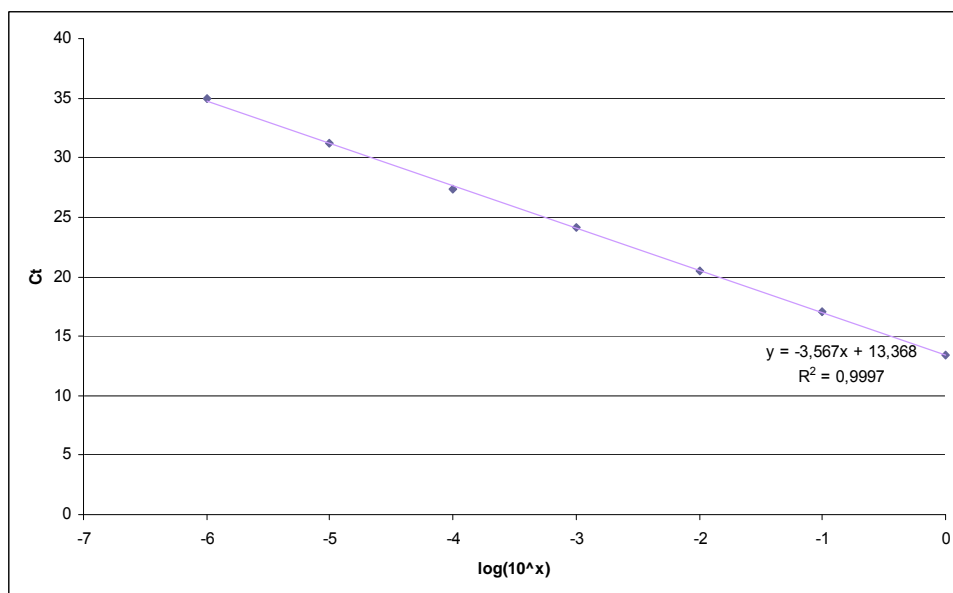
$$E = 10^{(-1/k)} - 1 = 10^{(-1/-3,567)} - 1 = 0,907 \quad \dots (4)$$

$$E = 90,7 \%$$

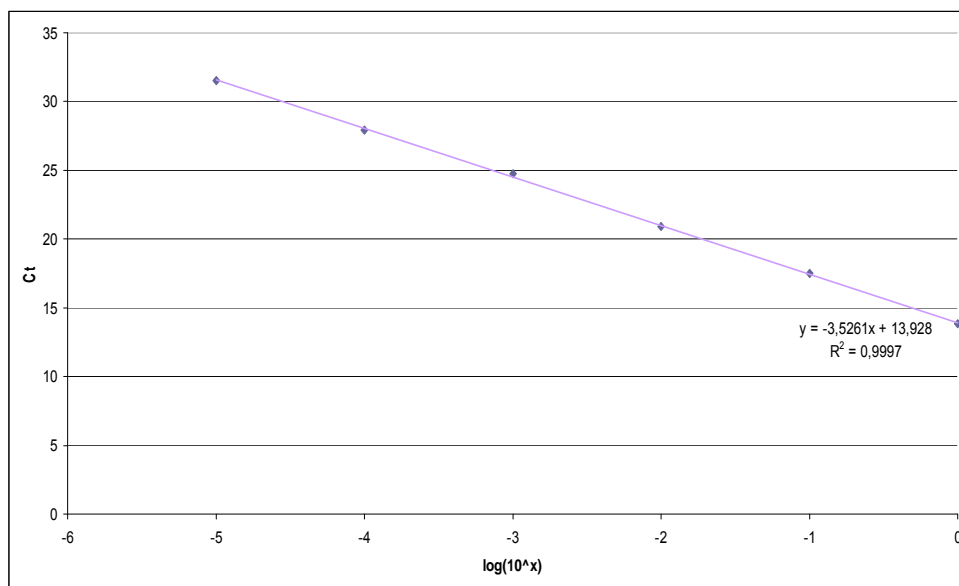
- s hkratnim pomnoževanjem interne kontrole

$$E = 10^{(-1/k)} - 1 = 10^{(-1/-3,5261)} - 1 = 0,921 \quad \dots (5)$$

$$E = 92,1 \%$$



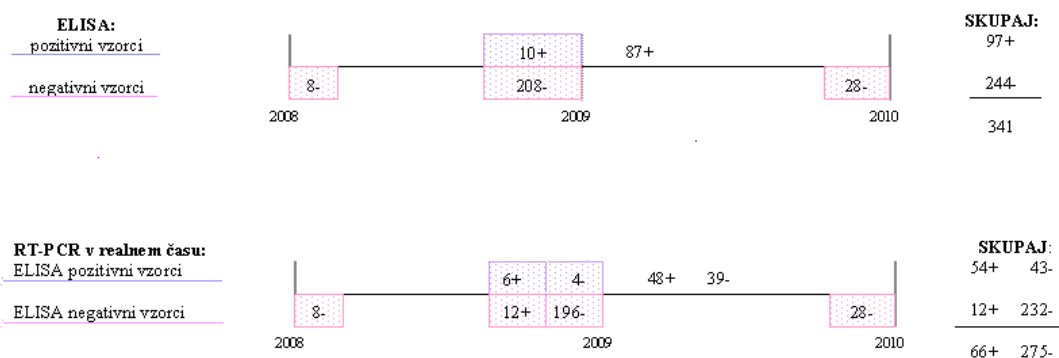
Slika 5: Učinkovitost pomnoževanja HAstV RNA



Slika 6: Učinkovitost pomnoževanja HAstV RNA s hkratnim pomnoževanjem interne kontrole (luc-RNA)

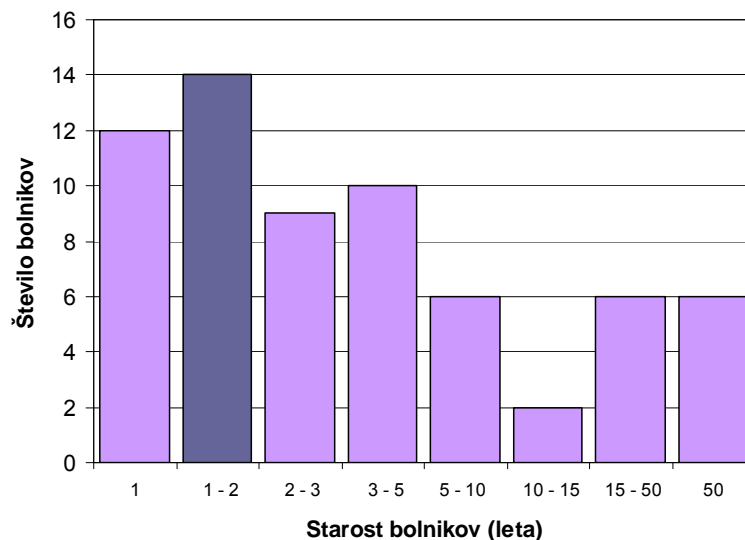
4.2 ZNAČILNOSTI VZORCEV

V obdobju od januarja 2008 do januarja 2010 smo pregledali skupaj 341 kliničnih vzorcev iztrebkov bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom, ki so jih prejeli v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo. V preiskanih vzorcih iztrebkov so s komercialnim encimskoimunskim testom (ELISA) v 97 primerih dokazali astrovirusne antigene, v preostalih (244) vzorcih pa antigenov niso dokazali. Iste vzorce smo nato testirali še z uvedeno molekularno metodo RT-PCR v realnem času. S slednjo metodo je bilo dejansko pozitivnih 66 vzorcev (slika 7).



Slika 7: Rezultati testiranja vzorcev z RT-PCR v realnem času, ki smo jih predhodno obdelali s testom ELISA

Vzorci bolnikov, pri katerih smo z molekularno metodo RT-PCR v realnem času dokazali astrovirusno okužbo (66), smo analizirali glede na starost. Starost bolnikov je bila zelo heterogena (od nekaj dni do 83 let), zato smo vzorce razdelili v 8 starostnih obdobjih. Kot je razvidno iz grafa (slika 8) prevladujejo bolniki v starostni skupini do dveh let (14). 12 bolnikov je bilo starih manj kot eno leto, 9 med 2. in 3. letom ter 10 med 3. in 5. letom starosti. V obdobjih med 5. in 15. letom smo zasledili 8 bolnikov, 12 pa jih je bilo starejših od 15 let. Za enega bolnika nimamo podatkov o starosti.



Slika 8: Število obolenih z astrovirusno okužbo glede na starost v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010 (n = 66)

4.3 DOKAZOVANJE HAstV RNA V VZORCIH S PREDHODNO DOKAZANIM ANTIGENOM HAstV Z ENCIMSKOIMUNSKIM TESTOM

V obdobju od januarja 2008 do januarja 2010 so v 97 od skupno testiranih 341 vzorcev iztrebkov bolnikov dokazali astrovirusne antigene. Naknadno smo v teh 97 vzorcih z metodo RT-PCR v realnem času dokazali RNA HAstV le v 54 vzorcih. Pri slednjih so predhodno z elektronsko mikroskopijo le v 7 vzorcih določili morfološko značilne astroviruse, v 11 vzorcih viruse z nejasno morfologijo-male okrogle viruse, v 35 vzorcih pa virusov niso določili.

Preglednica 2: Rezultati vzorcev z dokazanimi astrovirusnimi antigeni, ki so testirani z RT-PCR v realnem času v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010. Legenda: EM-elektronska mikroskopija, MOV-virusi z nejasno morfologijo, Astro-astrovirusi, Ag-antigen, OD-optična gostota, C_T - vrednost cikla praga detekcije, neg-negativno, poz-pozitivno.

Protokolna številka	EM	ELISA			HAstV RT-PCR v realnem času	
		HAstV Ag	OD	Mejna vrednost	HAstV RNA	C_T
25/08	neg	poz	0,172	0,115	neg	
118/08	neg	poz	1,576	0,109	neg	
214/08	neg	poz	2,907	0,111	neg	

215/08	neg	poz	0,326	0,111	neg	
--------	-----	-----	-------	-------	-----	--

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Preglednica 2: Rezultati vzorcev z dokazanimi astrovirusnimi antigeni, ki so testirani z RT-PCR v realnem času v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010. Legenda: EM-elektronska mikroskopija, MOV-virusi z nejasno morfologijo, Astro-astrovirusi, Ag-antigen, OD-optična gostota, C_T- vrednost cikla praga detekcije, neg-negativno, poz-pozitivno.

Protokolna številka	EM	ELISA			HAstV RT-PCR v realnem času	
		HAstV Ag	OD	Mejna vrednost	HAstV RNA	C _T
512/08	neg	poz	0,161	0,101	neg	
563/08	neg	poz	0,205	0,101	neg	
763/08	neg	poz	0,524	0,117	neg	
773/08	neg	poz	0,43	0,117	neg	
793/08	neg	poz	0,197	0,143	neg	
1029/08	neg	poz	0,126	0,114	neg	
1319/08	Kalici	poz	0,392	0,125	neg	
1665/08	neg	poz	1,663	0,111	neg	
1784/08	neg	poz	1,143	0,113	neg	
1872/08	Adeno	poz	1,663	0,105	neg	
1995/08	neg	poz	0,208	0,126	neg	
2198/08	neg	poz	0,15	0,108	neg	
2300/08	neg	poz	0,172	0,117	neg	
2337/08	neg	poz	0,232	0,117	neg	
2345/08	neg	poz	0,28	0,121	neg	
2385/08	neg	poz	0,26	0,107	neg	
2518/08	neg	poz	0,507	0,124	neg	
2542/08	neg	poz	0,173	0,124	neg	
2699/08	neg	poz	0,183	0,109	neg	
2778/08	neg	poz	0,432	0,112	neg	
3041/08	Astro	poz	0,876	0,108	neg	
3284/08	Kalici	poz	0,496	0,119	neg	
3326/08	neg	poz	0,166	0,104	neg	
3429/08	neg	poz	0,287	0,101	neg	
20/09	neg	poz	0,439	0,116	neg	
281/09	neg	poz	0,265	0,118	neg	
283/09	neg	poz	0,135	0,118	neg	
287/09	neg	poz	2,591	0,113	neg	
363/09	neg	poz	0,174	0,114	neg	
445/09	neg	poz	0,289	0,105	neg	
753/09	neg	poz	2,147	0,102	neg	
910/09	neg	poz	0,186	0,115	neg	
1344/09	neg	poz	0,533	0,126	neg	
1731/09	neg	poz	0,128	0,111	neg	
2050/09	neg	poz	0,314	0,109	neg	
2118/09	neg	poz	0,134	0,109	neg	
2137/09	neg	poz	0,155	0,109	neg	
2293/09	MOV	poz	0,202	0,112	neg	
3136/09	neg	poz	0,136	0,107	neg	
66/09	MOV	poz	2,494	0,118	poz	25,48

228/09	neg	poz	2,883	0,111	poz	17,6
--------	-----	-----	-------	-------	-----	------

Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Preglednica 2: Rezultati vzorcev z dokazanimi astrovirusnimi antigeni, ki so testirani z RT-PCR v realnem času v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010. Legenda: EM-elektronska mikroskopija, MOV-virusi z nejasno morfologijo, Astro-astrovirusi, Ag-antigen, OD-optična gostota, C_T- vrednost cikla praga detekcije, neg-negativno, poz-pozitivno.

Protokolna številka	EM	ELISA			HAstV RT-PCR v realnem času	
		HAstV Ag	OD	Mejna vrednost	HAstV RNA	C _T
304/08	neg	poz	1,997	0,122	poz	31,7
428/08	neg	poz	0,24	0,119	poz	19,64
859/08	neg	poz	2,163	0,123	poz	24,45
990/08	neg	poz	2,957	0,121	poz	21,56
1333/08	neg	poz	2,525	0,108	poz	21,38
1393/08	neg	poz	0,136	0,111	poz	22,64
1402/08	neg	poz	0,608	0,113	poz	17,69
1998/08	Astro	poz	0,97	0,126	poz	18,96
2423/08	neg	poz	2,035	0,115	poz	24,05
2467/08	neg	poz	2,139	0,115	poz	23,74
3381/08	neg	poz	2,532	0,119	poz	18,57
3389/08	neg	poz	2,293	0,112	poz	24,89
3399/08	Astro	poz	1,819	0,128	poz	23,5
3427/08	Astro	poz	2,539	0,128	poz	24,52
3441/08	MOV	poz	1,385	0,101	poz	29,14
3530/08	neg	poz	1,717	0,106	poz	26,9
353/09	neg	poz	0,989	0,114	poz	25,48
359/09	MOV	poz	1,766	0,114	poz	15,85
676/09	MOV	poz	1,592	0,104	poz	18,77
710/09	neg	poz	2,677	0,104	poz	20
781/09	neg	poz	3,206	0,102	poz	22,55
794/09	neg	poz	0,257	0,102	poz	23,43
1210/09	neg	poz	0,448	0,108	poz	22,78
1252/09	neg	poz	1,286	0,101	poz	19,32
1380/09	neg	poz	1,449	0,112	poz	26,62
1466/09	neg	poz	0,72	0,109	poz	25,65
1473/09	neg	poz	1,647	0,109	poz	22,96
1535/09	neg	poz	1,015	0,107	poz	20,74
1655/09	MOV	poz	1,321	0,101	poz	22,6
1723/09	neg	poz	1,711	0,114	poz	36,78
1836/09	neg	poz	0,304	0,108	poz	27,07
1954/09	neg	poz	0,125	0,103	poz	26,15
2029/09	neg	poz	1,356	0,111	poz	17,44
2614/09	MOV	poz	2,105	0,106	poz	17,24
2813/09	neg	poz	0,801	0,113	poz	16,76
2916/09	neg	poz	0,798	0,11	poz	25,26
2943/09	MOV	poz	1,345	0,115	poz	22,81
2974/09	neg	poz	1,443	0,101	poz	18,9
2983/09	Astro	poz	0,512	0,126	poz	25
2999/09	neg	poz	1,625	0,105	poz	24,54
3015/09	neg	poz	0,184	0,141	poz	17,49

3037/09	neg	poz	0,217	0,117	poz	25,84
---------	-----	-----	-------	-------	-----	-------

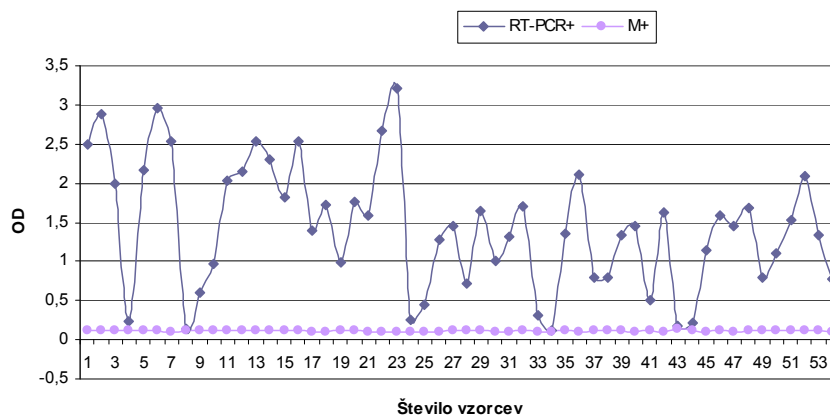
Se nadaljuje

Nadaljevanje:

Preglednica 2: Rezultati vzorcev z dokazanimi astrovirusnimi antigeni, ki so testirani z RT-PCR v realnem času v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010. Legenda: EM-elektronska mikroskopija, MOV-virusi z nejasno morfologijo, Astro-astrovirusi, Ag-antigen, OD-optična gostota, C_T - vrednost cikla praga detekcije, neg-negativno, poz-pozitivno.

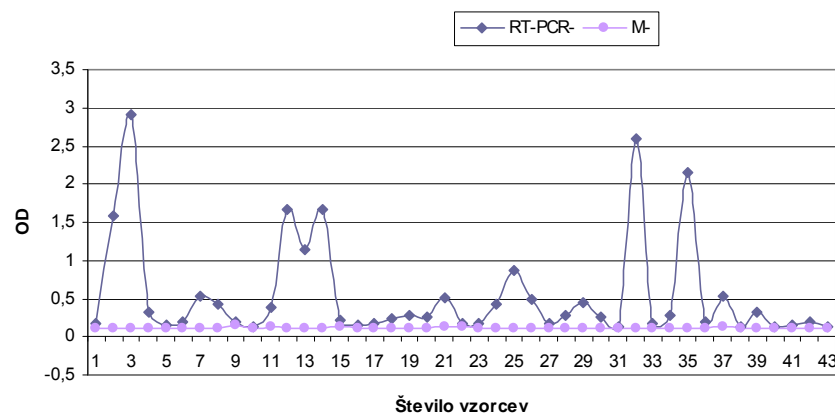
Protokolna številka	EM	ELISA			HAstV RT-PCR v realnem času	
		HAstV Ag	OD	Mejna vrednost	HAstV RNA	C_T
3057/09	Astro	poz	1,15	0,107	poz	16,59
3083/09	Astro	poz	1,596	0,112	poz	19,18
3096/09	Astro	poz	1,46	0,101	poz	16,94
3199/09	MOV	poz	1,678	0,112	poz	16,72
3218/09	neg	poz	0,79	0,119	poz	19,79
3224/09	neg	poz	1,096	0,119	poz	16,25
3257/09	neg	poz	1,527	0,113	poz	19,53
3291/09	neg	poz	2,087	0,121	poz	21,63
3300/09	neg	poz	1,334	0,109	poz	20,23
3320/09	neg	poz	0,777	0,105	poz	17,27

Vzorci, pri katerih smo z encimskoimunskim testom dokazali antigen HAstV smo naknadno testirali z metodo RT-PCR v realnem času. Porazdeljenost njihovih vrednosti OD z določenimi mejnimi vrednostmi, je prikazana na slikah 9 in 10.



Slika 9: Porazdeljenost RT-PCR pozitivnih vzorcev (n = 54)

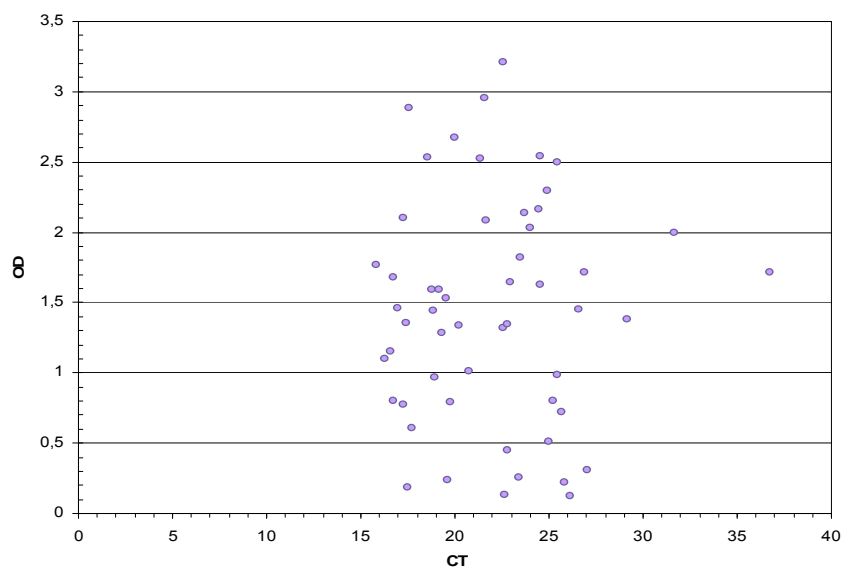
Legenda: RT-PCR+: pozitivno testirani vzorci z metodo RT-PCR v realnem času; M+: mejna vrednost OD pozitivnih vzorcev



Slika 10: Porazdeljenost RT-PCR negativnih vzorcev (n = 43)

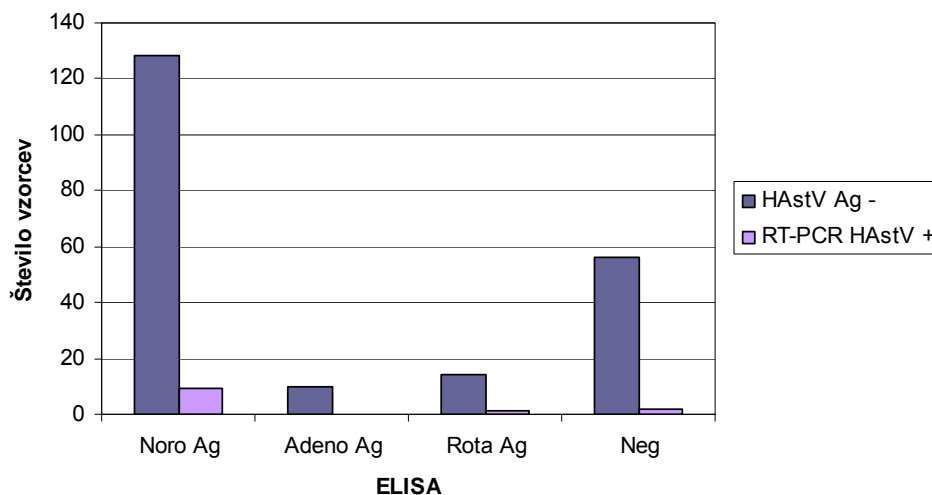
Legenda: RT-PCR-: negativno testirani vzorci z metodo RT-PCR v realnem času; M-: mejna vrednost OD negativnih vzorcev

Vzorci z dokazano HAstV RNA smo analizirali glede na vrednosti cikla praga detekcije (C_T) določenem pri RT-PCR v realnem času in optične gostote (OD) encimskoimunskega testa (ELISA). Odvisnost vrednosti OD od vrednosti C_T je prikazan na sliki 11. Ugotovili smo, da optična gostota (OD) ni povezana z vrednostjo C_T .

Slika 11: Prikaz odvisnosti OD od C_T za vzorce z dokazano HAstV RNA v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010 (n = 54)

4.4 ZNAČILNOSTI NEGATIVNIH VZORCEV POTRJENIH Z ENCIMSKO IMUNSKIM TESTOM (ELISA) V OBDOBJU OD JANUARJA 2008 DO JANUARJA 2010

Za 244 vzorcev iztrebkov bolnikov, pri katerih s testom ELISA nismo dokazali astrovirusnih antigenov, smo izvedli dodatno testiranje z RT-PCR v realnem času. Pri 127 od 244 vzorcih so predhodno ugotovili norovirusne antigene, dodatno smo med temi 127 vzorci pri 9-ih dokazali RNA HAstV. En pozitiven vzorec smo odkrili med 14 vzorci z dokazanimi rotavirusnimi antigeni, med tem ko med 10 vzorci z dokazanimi adenovirusnimi antigeni nismo dokazali astrovirusne RNA. Od 93 vzorcev, kjer predhodno niso določili antigenov gastroenteritičnih virusov, smo pri dveh določili astrovirusno RNA (slika 12). Astrovirusno RNA smo torej od skupnih 244 vzorcev, dokazali le pri 12 vzorcih.



Slika 12: Rezultati ELISA negativnih vzorcev za HAstV antigen, pregledanih z RT-PCR v realnem času v obdobju od januarja 2008 do januarja 2010 (n = 244)

LEGENDA: Noro-norovirus, Adeno-adenovirus, Rota-rotavirus, Ag-antigen, Neg-negativno.

4.5 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST ENCIMSKOIMUNSKEGA TESTA (ELISA)

Pri primerjavi testov ELISA in RT-PCR v realnem času smo predpostavljali višjo občutljivost in specifičnost testa RT-PCR v realnem času, zato smo le-tega v primerjavi obeh testov uporabili za »zlati standard«. Hoteli smo ugotoviti ustreznost encimskoimunskega testa pri testiranju kliničnih vzorcev.

Za primerjavo obeh testov in izračun specifičnosti in občutljivosti encimskoimunskega testa glede na rezultate RT-PCR v realnem času, smo zajeli vse vzorce poslane v laboratorij za dokazovanje enteritičnih virusov v obdobju od novembra 2008 do januarja 2009 (skupno 218 vzorcev). Na podlagi rezultatov (preglednica 2) smo izračunali občutljivost (33 %) in specifičnost (98 %) (Preglednica 3 in 4).

Preglednica 3: Rezultati vzorcev pregledanih z encimskoimunskim testom in RT-PCR v realnem času v obdobju od novembra 2008 do januarja 2009 (n =218)

		HAstV RNA		Skupaj
		poz	neg	
HAstV Ag	poz	6	4	10
	neg	12	196	208
Skupaj		18	200	218

Preglednica 4: Občutljivost in specifičnost encimskoimunskega testa (ELISA)

ELISA	
Občutljivost	33 %
Specifičnost	98 %

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Stalni nadzor z molekularnimi diagnostičnimi metodami, ki so se razvile zadnje desetletje je pokazal, da so astrovirusi skupaj z rotavirusi in kalicivirusi pomembni povzročitelji akutnega gastroenteritisa pri otrocih. Običajen potek bolezni je driska, ki jo lahko spremljajo povišana telesna temperatura in bruhanje. Bolezen poteka le nekaj dni, razen pri serotipu 3, kjer so opazili dolgotrajno drisko. Okužbe se pojavljajo povsod po svetu in prizadenejo zlasti majhne otroke in starejše osebe. Povprečna incidenca v razvitih državah je 2-9 %. Trenutno poznamo osem serotipov HAstV, med katerimi prevladuje serotip 1. S filogenetskimi raziskavami so ugotovili, da v določenem obdobju v določeni regiji kroži hkrati več sevov in da prihaja do raznolikosti prevladujočega serotipa. Le ta je posledica genetskih rekombinacij oz. antigenskega premika ali pojavljanja novih sevov (Guix in sod., 2005).

Čeprav je več laboratorijev razvilo metode z PCR v realnem času, s katerimi istočasno dokažejo številne enteritične virusne patogene kot so astrovirusi, norovirusi, enterovirusi in adenovirusi (Beuret, 2004; Rohayem in sod., 2004), pa pri večini epidemoloških raziskav dokazujejo astroviruse v vzorcih iztrebkov s specifičnim RT-PCR v realnem času. Nekateri avtorji raziskav uporabljajo visoko specifične začetne oligonukleotide, ki se prilegajo na ohranjene regije genoma, ki kodirajo nestrukturane proteine in nekodirajoče regije (NTRs). Spet drugi raje uporabljajo začetne oligonukleotide, ki nalegajo na kodirajoče regije kapsidnih proteinov (Guix in sod., 2005).

Ključno za ugotavljanje obolevnosti z astrovirusi, je nenehen razvoj hitrih ter občutljivih diagnostičnih molekularnih metod, kot je RT-PCR v realnem času in razvoj tipizacijskih metod. Z uporabo različnih tipizacijskih metod lahko namreč pridobimo informacije o serotipih in ostalih lastnostih patogenosti, ki nam pomagajo opisati HAstV seve, ki krožijo v populaciji (Guix in sod., 2005).

5.1.1 Delna optimizacija metode RT-PCR v realnem času za dokazovanje astrovirusne RNA

Število virusnih izbruhov akutnega virusnega gastroenteritisa narašča, zato je vedno večje povpraševanje po občutljivih testih, ki jih lahko izvedemo v kratkem času. Najobčutljivejša metoda molekularne virologije je trenutno verižna reakcija s polimerazo (PCR) in njene različice (RT-PCR v realnem času, itd.). Z vpeljavo izboljšanih molekularnih diagnostičnih metod v vsakodnevno laboratorijsko določanje virusov, lahko omejimo nadaljnjo širjenje okužb in jih tako poskušamo obvladovati (Svraka in sod, 2009).

S tem namenom smo za dokazovanje astrovirusne RNA v iztrebkih bolnikov uvedli referenčno metodo RT-PCR v realnem času, povzeto po predhodno opisani metodi (Svraka in sod., 2009). Avtorji so opisano metodo izvajali v dveh stopnjah, z ločeno reakcijo reverzne transkripcije. Zaradi hitrejše izvedbe, predvsem pa zmanjšanja možnosti kontaminacije, smo opisano metodo prilagodili v enostopenjsko reakcijo RT-PCR. V eni reakciji smo izvedli tako reverzno transkripcijo kot pomnoževanje virusne cDNA. Za razliko od Svrake in sod, ki so uporabljali reagente proizvajalca Roche Diagnostics GmbH, smo za dokazovanje astrovirusne RNA uporabljali komercialni komplet AgPath-IDTM (Ambion). Zaradi spremenjenih pogojev objavljene metode, smo morali ponovno preveriti značilnosti reakcije oz. izvesti optimizacijo metode RT-PCR.

Za čim boljšo učinkovitost reakcije smo primerjali koncentracijo začetnih oligonukleotidov. Najboljšo učinkovitost reakcije, med končnimi koncentracijami 500 nM, 750 nM in 900 nM, smo zaznali pri koncentraciji 750 nM (slika 4).

Pri ugotavljanju učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA, ki je znašala med 90 % in 102 %, smo hkrati določili tudi najvišjo vrednost cikla praga detekcije C_T (36). To je vrednost, do katere lahko z gotovostjo trdimo, da je signal pomnoževanja specifične astrovirusne cDNA stabilen oz. je PCR-pridelek pomnožena astrovirusna cDNA in ne kakšen drug nespecifičen pridelek. Tako smo dokazali, da je metoda dovolj zanesljiva in jo lahko uporabimo v diagnostiki pri dokazovanju astrovirusnih okužb.

Med drugim smo ugotavljali tudi vpliv reakcijskega volumna na uspešnost reakcije. Reakcijski volumen predpisan po protokolu komercialnega kompleta AgPath-IDTM (Ambion) smo znižali iz 25 μ l na 10 μ l. Volumen smo zmanjšali zato, da bi zmanjšali stroške testiranja, kar olajša vpeljavo metode v diagnostične virološke laboratorije. Ugotovili smo, da zmanjšan reakcijski volumen ne zmanjša uspešnosti reakcije.

Zanimal nas je vpliv predhodne 5 min denaturacije RNA na uspešnost reakcije. RNA molekula namreč ni popolnoma linearna. Lahko tvori sekundarne strukture in zato obstaja možnost, da se začetni oligonukleotidi ne morejo popolnoma prilegati na tarčno RNA. Po primerjavi obeh ponovitev smo ugotovili, da v primeru predhodne denaturacije reakcija ni uspešnejša. Prav tako smo v tem primeru opazili večje razlike vrednosti C_T med $10\times$ redčitvami in sicer več kot za idealnih 3,32 cikle. RT-PCR v realnem času smo tako v nadaljevanju izvajali brez predhodne denaturacije.

Uspešno pomnoževanje tarčne HAstV RNA ter inhibitorne lastnosti osamljene RNA smo ugotavljali z uporabo interne kontrole luc-RNA. Pred tem smo morali ugotoviti ali luc-RNA na kakršni koli način vpliva na učinkovitost pomnoževanja tarčne HAstV RNA. Tako smo v eni reakciji RT-PCR pomnoževali dve seriji redčitev tarčne HAstV RNA, pri čemer smo v drugo serijo dodali še hkrati luc-RNA, ki smo jo prepisali in njeno cDNA pomnoževali hkrati s tarčno HAstV RNA. Po primerjavi učinkovitosti obeh serij smo ugotovili, da vključena interna kontrola bistveno ne vpliva na pomnoževanje astrovirusne cDNA (slika 5 in 6), vpliva pa na njeno občutljivost. Ta se namreč zmanjša za eno $10\times$ razredčino tarčne RNA.

Pri nizkih koncentracijah HAstV RNA smo opazili, da hkratno pomnoževanje interne kontrole negativno vpliva na pomnoževanje HAstV cDNA in posledično vpliva na mejo detekcije. Opažen negativni učinek je verjetno posledica prekrivanja signalov ali porabe reagentov. To težavo smo razrešili tako, da smo v skupni reakcijski mešanici za dokazovanje luc-RNA in HAstV RNA, znižali koncentracijo začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje interne kontrole na 150 nM. Prav tako smo zmanjšali koncentracijo lucRNA do te mere, da je bila vrednost C_T za luc-RNA med 32 in 35.

5.1.2 Značilnosti pozitivnih in negativnih vzorcev potrjenih z encimskoimunskim testom (ELISA)

V obdobju od januarja 2008 do januarja 2010 so v laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo pregledali 341 vzorcev iztrebkov bolnikov, kjer so pri 97 vzorcih z encimskoimunskim testom dokazali astrovirusne antigene. Zaradi nizke občutljivosti testa ELISA smo vpeljali in optimizirali molekularno diagnostično metodo RT-PCR v realnem času. S slednjo metodo smo vzorce ponovno testirali. Od skupno 97 vzorcev z dokazanim HAstV antigenom smo z RT-PCR v realnem času dokazali HAstV RNA le v 54 vzorcih. S tem smo ugotovili, da je najverjetneje kar 44 % bolnikov, pri katerih smo s testom ELISA dokazali HAstV antigen, zbolelo za gastroenteritisom, katerega niso povzročili astrovirusi.

Pozitivne rezultate z RT-PCR v realnem času vrednotimo v obliki izrisane krivulje ter predvsem cikla praga detekcije (C_T), ki ju izpisuje program. V našem primeru je povprečen C_T 21,98. To pomeni, da se približno v 22. ciklu pomnoži dovolj astrovirusne cDNA, da se pojavi signal sonde in fluorescenčni signal preseže ozadje reakcije. Če primerjamo odvisnosti optične gostote (OD), na podlagi katere vrednotimo rezultate encimskoimunskega testa ELISA, od vrednosti C_T , bi do določene mere pričakovali slednje: višja kot je vrednost C_T nižja je vrednost OD. V našem primeru temu ni tako, temveč se vrednosti OD pri posameznih vrednostih C_T (17-27) razprostirajo od bližine mejnih vrednosti (M) pa vse do močno pozitivnih rezultatov z vrednostjo OD 2,9 (glej rezultate 4.3, slika 11).

Glede na to, da ima test ELISA nizko občutljivost lahko domnevamo, da so vzorci z vrednostjo OD v bližini mejne vrednosti bolj verjetno lažno pozitivni, kar je tudi razvidno iz slike 10. Večina RT-PCR pozitivnih vzorcev (slika 9) ima torej precej višje vrednosti OD od pripadajoče mejne vrednosti in obratno, večina negativnih ima OD vrednosti v bližini mejne vrednosti. Vendar se kljub temu pojavljajo vzorci, katerih OD vrednosti so precej višje od M v katerih pa z RT-PCR nismo dokazali astrovirusne RNA in obratno. Zato ne moremo podati priporočil, s katerimi bi lahko izboljšali občutljivost encimskoimunskega testa ELISA. V nasprotnem primeru bi sicer lahko določili sivo cono

(območje OD vrednosti v področju mejne vrednosti), kjer bi bilo potrebno vzorce ponoviti.

Za dokazovanje astrovirusov uporabljajo poleg encimskoimunskega testa tudi metodo neposredne elektronske mikroskopije (EM) kot uveljavljeno diagnostično metodo. Virusi imajo namreč značilno zgradbo, zato jih lahko po morfoloških posebnostih uvrstimo v določeno družino. Dokazovanje astrovirusov je s to metodo težavno, saj ima le 10 % astrovirusnih delcev značilno zvezdasto morfologijo. Poleg tega ima elektronska mikroskopija nizko občutljivost, saj je pogoj za opazovanje virusov zadostno število delcev (vsaj 10^7 delcev v 1 ml kužnine). Slednje navedbe smo ugotovili tudi v našem primeru, saj so z elektronsko mikroskopijo od 57 vzorcev z dokazano astrovirusno RNA določili značilne astroviruse le v 7 primerih. V 11 vzorcih so določili male okrogle viruse, v preostalih vzorcih pa virusov niso dokazali. Za dokazovanje virusov z EM je pomembna tudi velikost. Astrovirusi so z 28-38 nm premera kapside manjši v primerjavi z ostalimi virusi npr. rotavirusi (60-80 nm), adenovirusi (80-110 nm), zato jih težko opazimo oz. jih lahko zamenjamo z ostalimi majhnimi okroglimi virusi. Elektronska mikroskopija torej ni primerna za diagnostiko astrovirusnih okužb.

Tudi Cubitt in sod. so v raziskavi astrovirusnega izbruha na otroškem oddelku, kjer so primerjali metode EM, ELISA in RT-PCR, ugotovili nizko občutljivost metod EM in ELISA. V mnogih primerih je bila namreč koncentracija virusov premajhna za dokaz okužbe. V 10 od skupno 20 primerov virusov niso zaznali. Omenjeni metodi nista primerni za ugotavljanje asimptomatskih okužb bolnikov pri epidemiološkem ugotavljanju vira okužb (Cubitt in sod., 1999).

V 244 pregledanih vzorcih, pri katerih predhodno z encimskoimunskim testom niso dokazali astrovirusnih antigenov, smo z metodo RT-PCR v realnem času le pri 12 vzorcih določili astrovirusno RNA. Od tega v dveh primerih predhodno niso določili gastroenteričnih virusov. Pri ostalih 10 vzorcih so v 9 primerih dokazali norovirusne antigene, v 1 primeru pa rotavirusne antigene. Ker je teh primerov relativno malo, domnevamo, da ni prišlo do navzkrižnih reakcij pri dokazovanju astrovirusov, temveč rezultati nakazujejo mešane okužbe.

Pojavljanje astrovirusov z ostalimi enteričnimi virusi kot so rotavirusi, norovirusi in adenovirusi so zaznali tudi v ostalih raziskavah. Levidiotou in sod. so v Grčiji med pregledovanje vzorcev otrok, hospitaliziranih zaradi akutnega gastroenteritisa, zaznali 4,4 % mešanih okužb. V letih sta se skupaj najpogosteje (55,5 %) pojavljali rotavirusi ter astrovirusi (Levidiotou in sod., 2009). Astroviruse so skupaj z norovirusi določili tako v sporadičnih primerih kot posameznih izbruhih na Kitajskem (Liu in sod., 2010). V Španiji so v 3-letni raziskavi določili v 17,2 % mešane okužbe z ostalimi enteričnimi patogeni, medtem ko je v državah v razvoju, kjer so večinoma slabe higienske razmere, takšnih primerov od 33 % do 65 % (Guix in sod., 2002).

Okužbe z astrovirusi se najpogosteje pojavljajo pri otrocih. To potrjujejo tudi z naši rezultati. Večina bolnikov (45 od 66) pri katerih smo z RT-PCR v realnem času potrdili astrovirusno RNA so bili mlajši od 5 let. Astroviruse smo dokazali tudi pri šestih bolnikih starih nad 50 let med katerimi je bila najvišja starost 83 let. Slednje dokazuje, da se astrovirusne okužbe lahko pojavljajo tudi pri starejših bolnikih.

Astroviruse kot povzročitelje izbruha gastroenteritisa v domovih za ostarele pri starejših bolnikih so dokazali tudi v Avstraliji, z EM in RT-PCR pri 5 od 12 bolnikov z značilnimi kliničnimi znaki gastroenteritisa in z analizo nukleotidnih zaporedij so ugotovili astroviruse serotipa 1. Na podlagi teh zaključkov menijo, da je pri izbruhih gastroenteritisa pri starejših najpogostejši HAstV serotip 1 (Marshall in sod., 2007).

5.1.3 Občutljivost in specifičnost encimskoimunskega testa (ELISA) ProSpecT

ELISA je med serološkimi metodami, s katerimi določamo virusne antigene, najbolj uporaben diagnostični test in sicer zaradi visoke občutljivosti in specifičnosti. Test je enostaven in primeren predvsem za analizo večjega števila vzorcev. V primeru dokazovanja astrovirusnih antigenov iz kliničnih vzorcev iztrebkov bolnikov s sporadičnim gastroenteritisom, se žal metoda ni izkazala kot visoko občutljiva. Zaradi tega smo preverili specifičnost in občutljivost tega testa v primerjavi z rezultati vpeljane in izboljšane molekularne metode RT-PCR v realnem času.

Z encimskoimunskim testom (ELISA ProSpecT, Oxoid) so predhodno testirali 341 kliničnih vzorcev iztrebkov bolnikov. Test vsebuje kombinacijo specifičnih monoklonskih in poliklonskih protiteles in konjugat z označevalcem za določanje vseh do sedaj znanih sevov človeških astrovirusov. Zajeli smo vse vzorce v obdobju od novembra 2008 do januarja 2009, ter jih dodatno testirali z metodo RT-PCR v realnem času. Po analizi podatkov je občutljivost znašala 33 %, specifičnost pa 98 %. Verjetnost, da bo test pozitiven pri osebah, ki so zbolele za gastroenteritisom, ki ga domnevno povzročajo astrovirusi (občutljivost), je zelo nizka. Proizvajalec testa ProSpecT sicer na podlagi izvedene klinične študije navaja 100% občutljivost in 98,3% specifičnost. Slednja je skladna z našimi rezultati.

Upoštevajoč rezultate našega testiranja lahko sklepamo, da metoda zaradi zelo nizke občutljivosti ni primerna za dokazovanje astrovirusov v človeških iztrebkih pri sporadičnih primerih okužb.

Pred uporabo molekularnega testa za dokazovanje HAstV RNA je potrebno ugotoviti še, kolikšen delež asimptomatskih okužb zajamemo s testom z visoko občutljivostjo in po potrebi glede na vrednosti C_T in klinično sliko, definirati meje za smotno diagnostiko.

5.2 SKLEPI

Uveljavljene diagnostične metode za dokazovanje astrovirusov (ELISA, EM) kažejo zelo nizko občutljivost, zato smo vpeljali izboljšano diagnostično metodo RT-PCR v realnem času.

Po optimizaciji metode smo testirali 97 vzorcev iztrebkov bolnikov, kjer so predhodno dokazali astrovirusne antigene. Z reakcijo RT-PCR smo določili astrovirusno RNA le v 56 % vzorcev. Ker je delež pozitivnih rezultatov pri občutljivejši molekularni metodi RT-PCR nižji, lahko sklepamo, da je pri testu ELISA kar 44 % vzorcev lažno pozitivnih.

Potrdili smo, da se astrovirusne okužbe pojavljajo predvsem pri otrocih starih do 5 let, saj je v našem primeru takih bolnikov kar 69 %.

Po primerjavi rezultatov encimskoimunske metode in RT-PCR v realnem času, je občutljivost testa ELISA znašala 33 %, specifičnost pa 98 %. S tem smo dokazali, da zaradi nizke občutljivosti test ELISA ni zadostna metoda s katero bi dokazovali sporadične primere astrovirusnih okužb.

6 POVZETEK

Človeški astrovirusi so drugi najpogostejši povzročitelji gastroenteritisa pri majhnih otrocih starih do 5 let. Dandanes v rutinski diagnostiki astrovirusnih okužb večinoma uporabljajo encimskoimunske teste, katerih občutljivost ni zadostna. Zato smo uvedli in delno optimizirali občutljivejšo enostopenjsko reakcijo RT-PCR v realnem času.

Z metodo RT-PCR v realnem času smo, v obdobju med januarjem 2008 in decembrom 2009, pregledali 341 vzorcev iztrebkov bolnikov, obolelih z virusnim gastroenteritisom. Uporabili smo začetne oligonukleotide in sondo, ki pokrivajo vseh osem serotipov astrovirusov.

V 97 vzorcih, ki so bili predhodno pozitivni z encimskoimunskim testom (ProSpecT - Oxoid), smo dokazali astrovirusno RNA le v 66 primerih.

Med preostalimi 244 vzorci, kjer niso dokazali astrovirusnih antigenov, je bilo pozitivnih le 12 vzorcev.

Po pregledu 218 vzorcev sta bili občutljivost in specifičnost encimskoimunskega testa ProSpecT 33% in 98%. Kot zlati standard smo uporabili RT-PCR v realnem času.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili nizko občutljivost encimskoimunskega testa. Menimo, da bi bilo za rutinsko dokazovanje astrovirusov smotrno uporabiti molekularno metodo enostopenjske reakcije RT-PCR v realnem času.

7 VIRI

- Appleton H., Higgins P.G. 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*, 305, 7919:1297-1297
- Avšič Županc T. 2007. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 119-128
- Brown D.W., Gunning K.B., Henry D.M., Awdeh Z.L., Brinker J.P., Tzipori S., Herrmann J.E. 2008. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human astrovirus serotypes. *Journal of Virological Methods*, 147: 86-92
- Beuret C. 2004. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virology Methods*, 115, 1: 1-8
- Blacklow N.R., Herrmann J.E. 1995. Astrovirus gastroenteritis. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 106: 58-68
- Cell Signaling Technology. 2010. PathScan® Phospho-ELISA kits for the quantification of "site"-specific activation or total protein. Frankfurt, New England Biolabs Inc.: 1 str. http://newenglandbiolabs.de/en/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=20 (marec 2010)
- Cubitt W.D., Mitchell M.J., Carter M.J., Willcocks M.M., Holzel H. 1999. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of Astrovirus Type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *Journal of Medical Virology*, 57: 313-321
- Donelli G., Superti F., Tinari A., Marziano M.L. 1992. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *Journal of Medical Virology*, 38, 4: 271-277

ICTV. 2009. Virus Taxonomy: Astrovirus. New York, ICTV-International Committee on Taxonomy of Viruses: 1 str.

<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009> (julij 2010)

Finkbeiner S.T., Kirkwood C.D., Wang D. 2008. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virology Journal*, 5: 117-117

Finkbeiner S.R., Holtz L.R., Jiang Y., Rajendran P., Franz C.J., Zhao G., Kang G., Wang D. 2009. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel Astroviruses. *Virology Journal*, 6:161-161

Fratnik A. 2005. Molekularno določanje človeških astrovirusov v iztrebkih bolnikov, obolelih za virusnim gastroenteritisom. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 42 str.

Glass R.I., Noel J., Mitchell D., Herman J.E., Blacklow N.R., Pickering L.K., Dennehy P., Ruiz-Palacios G., de Guerrero M.L., Monroe S.S. 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Archives of Virology Supplementum*, 12: 287-300

Guix S., Bosch A., Pintó R.M. 2005. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospect. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 103-105

Guix S., Caballero S., Villena C., Bartolome R., Latorre C., Rabella N., Simo M., Bosch A., Pinto R.M. 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1: 133-139

Hazelton P.R., Gelderblom H.R. 2003. Electron microscopy for rapid diagnostic of infectious agents in emergent situations. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 3: 294-303

Herrmann J.E., Nowak N.A., Perron-Henry D.M., Hudson R.W., Cubitt W.D., Blacklow N.R. 1990. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases*, 161, 2: 226-229

Jääskeläinen A.J., Maunula L. 2006. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astroviruses. *Journal of Virological Methods*, 136: 210-216

Jakab F., Meleg E., Bányai K., Melegh B., Tímár L., Péterfai J., Szücs G. 2004. One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: Occurrence and genetic analysis of astroviruses. *Journal of Medical Virology*, 74: 71-77

James K. 1990. Immunoserology of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 2: 132-152

Jiang B., Monroe S.S., Koonin E.V., Stine S.E., Glass R.I. 1993. RNA sequence of astrovirus: Distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of the America*, 90, 22: 103-105

Koci M.D. 2005. Immunity and resistance to astrovirus infection. *Viral Immunology*, 18, 1:11-16

Koci M.D., Moser L.A., Kelley L.A., Larsen D., Brown D.D., Schultz-Cherry S. 2003. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. *Journal of Virology*, 77, 21: 11798-11808

Koopmans M.P., Bijen M.H., Monroe S.S., Vinjé J. 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in the Netherlands. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 1: 33-37

Kurtz J.B., Lee T.W. 1984. Human astrovirus serotypes. *Lancet*, 324, 8416: 1405-1405

Lee T.W., Kurtz J.B. 1981. Serial propagation of Astrovirus in tissue culture with the aid of Trypsin. *Journal of General Virology*, 57: 421-424

Levidiotou S, Gartzonika C., Papaventsis D., Christaki C., Priavali E., Zotos N., Kapsali E., Vrioni G. 2009. Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 6: 596-598

Lewis T.L., Greenberg H.B., Herrmann J.E., Smith L.S., Matsui S.M. 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *Journal of Virology*, 68, 1: 77-83

Liu M.Q., Yang B.F., Peng J.S., Zhou D.J., L., Wang B., Liu Y., Sun S.H., Ho W.Z. 2007. Molecular epidemiology of astrovirus infection in infants in Wuhan, China. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 4: 1308-1309

Liu L.J., Liu W., Liu Y.X., Xiao H.J., Jia N., Liu G., Tong Y.G., Cao W.C. 2010. Identification of norovirus as the top enteric viruses detected in adult cases with acute gastroenteritis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 4: 717-722

Madeley C.R. 1979. Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of feces by electron microscopy. *Journal of Infectious Diseases*, 139: 519-523

Madeley C.R., Cosgrove B.P. 1975. 28-nm particles in feces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, 2: 451-452

Marin J. 2007. Neposredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 109-118

- Marshall J.A., Bruggink L.D., Sturge K., Subasinghe N., Tan A., Hogg G.G. 2007. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26, 1: 67-71
- Méndez E., Arias C.F. 2007. Astroviruses. V: *Fields virology*. Vol. 1. 5th ed. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Lippincott, Williams & Wilkins: 982-1000
- Méndez-Toss M., Romero-Guido P., Munguía M.E., Méndez E., Arias C.F. 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *Journal of General Virology*, 81: 2891–2897
- Midthun K., Greenberg H.B., Kurtz J.B., Gary G.W., Lin F.Y., Kapikian A.Z. 1993. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 4: 955-962
- Mitchell D.K., Monroe S.S., Jiang X., Matson D.O., Glass R.I., Pickering L.K. 1995. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*, 172: 1437–1444
- Moe C.L., Allen J.R., Monroe S.S., Gary H.E., Humphrey C.D., Herrmann J.E., Blacklow N.R., Carcamo C., Koch M., Kim K.H., Glass R.I. 1991. Detection of astrovirus in pediatric stool samples by immunoassay and RNA probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 11: 2390-2395
- Monroe S.S., Jiang B., Stine S.E., Koopmans M., Glass R.I. 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of *Astroviridae* as a new family of RNA viruses. *Journal of Virology*, 67, 6: 3611-3614

- Monroe S.S., Holmes J.L., Belliot G.M. 2001. Molecular epidemiology of human astroviruses. *Novartis Foundation Symposium*, 238: 237–45
- Mustafa H., Palombo E.A., Bishop R.F. 1998. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCO-2 cells. *Journal of Clinical Virology*, 11: 103-107
- Naficy A.B., Rao M.R., Holmes J.L., Abu-Elyazeed R., Savarino S.J., Wierzba T.F., Frenck R.W., Monroe S.S., Glass R.I., Clemens J.D. 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *Journal of Infectious Diseases*, 182, 3: 685-690
- Noel J.S., Lee T.W., Kurtz J.B., Glass R.I., Monroe S.S. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 4: 797-801
- Oishi I., Yamazaki K., Kimoto T., Minekawa Y., Utagawa E., Yamazaki S., Inouye S., Grohmann G.S., Monroe S.S., Stine S.E. 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *Journal of Infection Diseases*, 170, 2: 439-443
- Oliver A.R., Phillips A.D. 1988. An electron microscopical investigation of faecal small round viruses. *Journal of Medical Virology*, 24: 211-218
- Risco C., Carrascosa J.L., Pedregosa A.M., Humphrey C.D., Sanchez-Fauquier A. 1995. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *Journal of General Virology*, 76: 2075-2080
- Rohayem J., Berger S., Juretzek T., Herchenröder O., Mogel M., Poppe M., Henker J., Rethwilm A. 2004. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect norovirus, astrovirus and adenovirus in clinical stool samples. *Journal of Virology Methods*, 118, 1: 49-59

- Royuela E., Negro A., Sánchez-Fauquier A. 2006. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *Journal of Virology Methods*, 133: 14-19
- Rutledge R.G., Cote C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31, 16: e93, doi: 10.1093/nar/gng/093: 6 str.
- Saito K., Ushijima H., Nishio O., Oseto M., Motohiro H., Ueda Y., Takagi M., Nakaya S., Ando T., Glass R. 1995. Detection of astroviruses from stool samples in Japan using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *Microbiology and Immunology*, 39, 10: 825-828
- Sdiri-Loulizi K., Gharbi-Khelifi H., Rougemont A., Hassine M., Chouchane S., Sakly N., Pothier P., Guédiche M.N., Aouni M., Ambert-Balay K. 2009. Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. *Journal of Medical Virology*, 81: 1895-1902
- Sebire N.J., Malone M., Shah N., Anderson G., Gaspar H.B., Cubitt W.D. 2004. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *Journal of Clinical Pathology*, 57: 1001–1003
- Singh P.B., Sreenivasan M.A., Pavri K.M. 1989. Viruses in acute gastroenteritis in children in Pune, India. *Epidemiology Infection*, 102, 2: 345-353
- Svraka S., Veer B., Duizer E., Dekkers J., Koopmans M., Vennema H. 2009. Novel approach for detection of enteric viruses to enable syndrome surveillance of acute viral gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 6: 1674-1679
- Traore O., Belliot G., Mollat C., Piloquet H., Chamoux C., Laveran H., Monroe S.S., Billaudel S. 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *Journal of Clinical Virology*, 17: 151–158

VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44: 619-626

Wacker M.J., Godard M.P. 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using superscript III. *Journal of Biomolecular Techniques*, 16, 3: 266–271

Willcocks M.M., Carter M.J., Madeley C.R. 1992. Astroviruses. *Reviews in Medical Virology*, 2: 97-106

Willcocks M.M., Brown T.D.K., Madeley C.R., Carter M.J. 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *Journal of General Virology*, 75: 1785-1788

Zhang Z., Mitchell D.K., Afflerbach C., Jakab F., Walter J., Zhang Y.J., Staat M.A., Azimi P., Matson D.O. 2006. Quantitation of human astrovirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. *Journal of Virological Methods*, 134: 190-196