

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tanja CVITANOVIĆ

**ANALITIČNA IN KLINIČNA OPREDELITEV TESTA
ZA DOKAZOVANJE ČLOVEŠKIH
PAREHOVIRUSOV V CEREBROSPINALNI
TEKOČINI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tanja CVITANOVIĆ

**ANALITIČNA IN KLINIČNA OPREDELITEV TESTA ZA
DOKAZOVANJE ČLOVEŠKIH PAREHOVIRUSOV V
CEREBROSPINALNI TEKOČINI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANALYTICAL AND CLINICAL EVALUATION OF TEST FOR
DETECTION OF PARECHOVIRUSES IN CEREBROSPINAL FLUID**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitsov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu študijske komisije dodiplomskega študija biologije z dne 9. 3. 2012 ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Mario Poljak, dr. med., in za recenzentko doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ, univ. dipl. biol.
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mario POLJAK, dr. med.
 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA, univ. dipl. biol.
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana Tanja Cvitanović se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Cvitanović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 578.835(043.2)=163.6 virusi/parehovirusi/HPeV/okužbe osrednjega živčevja/molekularne tehnike/osamitev nukleinske kisline/verižna reakcija s polimerazo/PCR z reverzno transkripcijo/RT-PCR v realnem času/določanje nukleotidnega zaporedja/Parechovirus r-gene/Argene
KG	CVITANOVIĆ, Tanja POLJAK, Mario (mentor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka) SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo 2012
AV	ANALITIČNA IN KLINIČNA OPREDELITEV TESTA ZA
SA	DOKAZOVANJE ČLOVEŠKIH PAREHOVIRUSOV V
KZ	CEREBROSPINALNI TEKOČINI
ZA	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
LI	X, 54 str., 5 pregl., 5 sl., 2 pril., 64 vir.
TD	sl
OP	sl/en
IJ	Človeški parehovirusi (HPeV), ki jih uvrščamo v družino <i>Picornaviridae</i> , so pogosti povzročitelji okužb dihal in prebavil ter osrednjega živčevja pri mlajših otrocih. Zaradi vse pogostejšega pojavljanja HPeV, kot povzročitelja okužb osrednjega živčevja, smo žeeli določiti zanesljiv test za dokazovanje HPeV v vzorcih cerebrospinalne tekočine (CSF). Žeeli smo določiti analitično in klinično občutljivost ter klinično specifičnost komercialno dostopnega kompleta reagentov "Parechovirus r-gene™" (Argene, Biomerieux, Verniolle, Francija), ki temelji na dokazovanju RNA HPeV z RT-PCR v realnem času. Zanimalo nas je, ali je test dovolj zanesljiv za hitro določanje HPeV v vzorcih CSF pri kliničnem sumu na okužbo osrednjega živčevja pri otrocih do petega leta starosti. V 41 kliničnih vzorcih CSF, v katerih niso bili dokazani drugi povzročitelji okužb osrednjega živčevja, smo z RT-PCR v realnem času dokazali RNA HPeV v 15 % (6/41) vzorcev. RNA HPeV smo v teh vzorcih potrdili tudi s klasično enostopenjsko RT-PCR. V vseh 6 pozitivnih vzorcih smo dokazali genotip HPeV3. S testiranjem vzorcev CSF, v katerih so bili predhodno dokazani drugi virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja, smo dokazali 100 % specifičnost kompleta "Parechovirus r-gene™". S testiranjem serijskih 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1, smo določili najnižjo mejo testa pri koncentraciji virusnega titra 3,16 TCID ₅₀ /ml. Komplet "Parechovirus r-gene™" ustreza vsem merilom zanesljivega testa za diagnostično dokazovanje prisotnosti HPeV v CSF.
JI	
AI	

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 578.835(043.2)=163.6 viruses/parechovirus/HPeV/central nervous system infections/molecular techniques/nucleid acid extraction/polymerase chain reaction/reverse transcription PCR/real-time RT-PCR /nucleid acid sequence determination/Parechovirus r-gene/Argene
CX	PARECHOVIRUS R-GENE/ARGENE
AU	CVITANOVIĆ, Tanja
AA	POLJAK, Mario (supervisor)/ HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 11
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
PY	2012
TI	Analytical and clinical evaluation of test for detecting of parechoviruses in cerebrospinal fluid
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	X, 54 p., 5 tab., 5 fig., 2 ann., 64 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Human parehoviruses (HPeV) belongs to the family of <i>Picornaviridae</i> . They cause wide spectrum of diseases in the respiratory, gastrointestinal and central nervous system (CNS) in young children. Due to the increasing occurrence of HPeV infections as a cause of central nervous system diseases, we wanted to develop a reliable method for detecting HPeV in cerebrospinal fluid (CSF) samples. The aim of our research was to determine both analytical and clinical sensitivity and clinical specificity of the commercially available kit Parechovirus r-gene™ (Argene, Biomerieux, Verniolle, France). Also, based on real-time reverse-transcription PCR assay, it's reliability for the rapid diagnosis of HPeV in CSF was tested. The CSF samples used in this study were obtained from patients under the age of five with clinical suspicion of the CNS infection. 71 samples of CSF were included in the study. 41 clinical samples didn't show any other viral pathogens that cause the central nervous system infections. HPeV RNA was found in 15% (6/41) of samples by real time RT-PCR. In these samples HPeV RNA was confirmed by one-step RT-PCR. In all (6/6) positive samples HPeV3 genotype was confirmed by nucleotide sequence analyses. Hundred percent (100%) specificity to HPeV of Parechovirus r-gene™ was tested with 30 samples of CSF that were previously tested and they included RNA of other viral pathogens (EV, HSV) that cause infections of the central nervous system. The limit of detection of Parechovirus r-gene™ was determined at a concentration of 3.16 TCID50/ml of viral titre by testing 10x serial dilutions of HPeV1 cell culture..

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1. UVOD	1
1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2. PREGLED OBJAV	3
2.1. PAREHOVIRUSI	3
2.1.1 Zgodovinski pregled	3
2.1.2 Taksonomska uvrstitev	4
2.1.3 Molekularne značilnosti	5
2.1.4 Patogeneza	8
2.1.5 Rizične skupine	9
2.1.6 Klinična slika	10
2.1.7 Epidemiologija	11
2.1.8 Diagnostika	13
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Celična kultura	15
3.1.2 Vzorci cerebrospinalne tekočine	16
3.2 METODE	17
3.2.1 Postopek osamitve RNA	17
3.2.1.1 Postopek ročne osamitve virusne RNA	17
3.2.1.2 Postopek avtomatske osamitve virusne RNA	18
3.2.2. Verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo	19
3.2.2.1 Dokazovanje HPeV z RT-PCR v realnem času	19
3.2.2.2 Dokazovanje HPeV s klasično enostopenjsko RT-PCR	21
3.2.2.2.1 Dokazovanje pridelkov PCR klasične enostopenjske RT-PCR	23
3.2.3 Določanje analitičnih in kliničnih lastnosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM” za dokazovanje HPeV v cerebrospinalni tekočini	24
3.2.3.1 Pomnoževanje redčin celične kulture HPeV1 s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene TM ”	24
3.2.3.2 Določanje meje detekcije komercialnega kompleta “Parechovirus r-gene TM ”	24
3.2.3.3 Določanje klinične specifičnosti in preverjanje navzkrižne reaktivnosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-gene TM ”	25

3.2.3.4 Določanje klinične občutljivosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-gene™”	25
3.2.4 Metoda neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja.....	25
4. REZULTATI.....	30
4.1 REZULTATI POMNOŽEVANJE REDČIN CELIČNE KULTURE HPEV1 S KOMERCIALNIM KOMPLETOM “PARECHOVIRUS R-GENE™”	30
4.2 REZULTATI DOLOČANJA ANALITIČNE OBČUTLJIVOSTI KOMERCIALNEGA KOMPLETA “PARECHOVIRUS R-GENE™”	31
4.3 DOLOČANJE KLINIČNE SPECIFIČNOSTI IN PREVERJANJE NAVZKRIŽNE REAKTIVNOSTI KOMERCIALNEGA KOMPLETA “PARECHOVIRUS R-GENE™”	32
4.4 DOLOČANJE KLINIČNE OBČUTLJIVOSTI KOMERCIALNEGA KOMPLETA .	34
4.4.1 Značilnosti vzorcev in preiskovancev	34
4.4.2 Dokazovanje HPeV v kliničnih vzorcih CSF z “Parechovirus r-gene™”	34
4.4.3 Dokazovanje HPeV v kliničnih vzorcih CSF s klasično enostopenjsko RT-PCR	36
4.4.4 Primerjava rezultatov testa “Parechovirus r-gene™” in klasične enostopenjske RT-PCR	36
4.4.5 Določitev nukleotidnega zaporedja.....	37
5. RAZPRAVA IN SKLEPI.....	38
5.1 RAZPRAVA.....	38
5.2 SKLEPI.....	43
6. POVZETEK.....	44
7. VIRI	46
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Priprava 10-kratnih redčin celične kulture HPeV v vodni raztopini z nosilno RNA	16
Preglednica 2: Vsebina reakcijske mešanice za dokazovanje HPeV s klasično enostopenjsko RT-PCR	22
Preglednica 3: Rezultati pomnoževanje 10-kratnih redčin celične kulture HPeV1 s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene TM ”	30
Preglednica 4: Rezultati določanja analitične občutljivosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-gene TM ” s testiranjem 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1	32
Preglednica 5: Oznaka vzorca, spol, starost preiskovancev in Ct-vrednosti RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene TM ” v HPeV pozitivnih kliničnih vzorcih CSF	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz taksonomske razvrstitev družine <i>Picornaviridae</i> (Stanway in Hyypiä, 1999)	5
Slika 2: Organizacija zaporedij v genomu HPeV, ki kodirajo proteine (Harvala in Simmonds, 2009)	7
Slika 3: Amplifikacijske krivulje testa “Parechovirus r-gene TM ” 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1, sev HR-11722-07.	31
Slika 4: Rezultat poskusa dokazovanja klinične specifičnosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-gene TM ”	33
Slika 5: Amplifikacijske krivulje pozitivnih kliničnih vzorcev CSF, pridobljenih z RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene TM ”	36

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati (Ct vrednosti) testiranja 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1, sev HR-11722-07 s testom “Parechovirus r-gene TM ”	56
Priloga B: Seznam 41 kliničnih vzorcev CSF, v katerih niso bili dokazani drugi virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja, testiranih z RT-PCR v realnem času in “Parechovirus r-gene TM ” ter klasično enostopenjsko RT-PCR	57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CPE	citopatski efekt
EV	človeški enterovirusi
HPeV	človeški parehovirusi
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	ribonukleinska kislina
RGD	arginin-glicin-asparaginska kislina (angl. <i>arginine-glycine-aspartic acid</i>)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
UTR	nekodirajoče zaporedje (angl. <i>untranslated region</i>)
bp	bazni par
µl	mikroliter – enota za merjenje količine
M	molarnost – enota za merjenje koncentracije
ng	nanogram – enota za merjenje mase
rpm	število obratov na minuto (angl. <i>rotations per minute</i>)
HSV	človeški virus herpes simpleks
EBV	virus Epstein-Barr
CSF	cerebrospinalna tekočina (angl. <i>cerebrospinal fluid</i>)
Ct	Ct- vrednost (angl. <i>cycle threshold</i>)

1. UVOD

Človeški parehovirusi (angl. *Human Parechovirus*, HPeV) sestavljajo majhno skupino RNA virusov, ki so taksonomsko uvrščeni v družino *Picornaviridae*, rod *Parechovirus*. Ikozaedrična kapsida, ki ščiti RNA, je sestavljena iz treh strukturnih beljakovin (Stanway in Hyypiä, 1999).

Preden so jih uvrstili v poseben rod, so bili uvrščeni v rod *Enterovirus*. Na osnovi bioloških in molekularnih lastnosti, ki so odstopale od lastnosti enterovirusov, so *Echovirus* 22 in 23 uvrstili v novi rod *Parechovirus* in ju preimenovali v človeški parehovirus 1 in 2 (HPeV1 in HPeV2) (Stanway in Hyypiä, 1999). Danes rod *Parechovirus* zajema 16 genotipov HPeV (Chieochansin in sod., 2011).

Za določanje HPeV v vzorcih blata, brisa nosu in cerebrospinalne tekočine se uporabljo različne metode. Najstarejša metoda je osamitev v celični kulturi. Pomanjkljivosti te metode so zamudnost, možna zamenjava z enterovirusi in lažno negativni rezultati zaradi nizke koncentracije virusa, zato ni najbolj primerna za rutinsko diagnostiko. Danes se pogosteje uporabljo molekularne metode, ki so dostopnejše, bolj specifične in bolj občutljive (Harvala in Simmonds, 2009).

HPeV povzročajo širok spekter okužb, kot so aseptični meningitis, encefalitis, neonatalna sepsa, miokarditis, limfadenitis, miozitis ter bolezni dihal in prebavil. Okužbam s HPeV so najbolj izpostavljeni majhni otroci. S starostjo je pogostost okužb nižja (Harvala in sod., 2011). Najbolj razširjena sta genotipa HPeV1 in HPeV3. HPeV1 je razširjen po vsem svetu in pogosto povzroča obolenja dihal in prebavil pri mlajših otrocih. Zadnje čase je v ospredju pozornosti genotip HPeV3 kot povzročitelj okužb osrednjega živčevja, ki ga dokažemo v vzorcu cerebrospinalne tekočine. Najbolj prizadeti so novorojenčki in dojenčki do enega leta starosti (Levorson in Jantausch, 2009).

Genotipi HPeV imajo medsebojno različen celični tropizem, kar lahko posledično vodi tudi do različne patogeneze med njimi. Ustrezan način zdravljenja za zdaj ni znan (Harvala in Simmonds, 2009).

1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE

Zaradi zamudnega dokazovanja HPeV okužb z osamitvijo v celični kulturi se v zadnjem času za diagnostično dokazovanje HPeV uporablja molekularna metoda verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo v realnem času (angl. *real time RT-PCR*). Ker se v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete že dolgo ukvarjajo s problematiko diagnostike parehovirusov v cerebrospinalni tekočini, je bil namen diplomske naloge najti učinkovit test za dokazovanje HPeV. V tem času se je na tržišču pojavil komercialni diagnostični komplet reagentov za diagnostiko HPeV. "Parechovirus r-gene" (Argene, Verniolle, Francija) je zanesljiv molekularni test za hitro ugotavljanje HPeV v vzorcih cerebrospinalne tekočine. Je preprost za uporabo. Ker gre za razmeroma nov komplet reagentov na tržišču, smo ga preizkusili. Ker je ustrezal potrebam hitrega in specifičnega dokazovanja HPeV v vzorcih cerebrospinalne tekočine, smo želeli preveriti analitično in klinično občutljivost ter klinično specifičnost testa. Za vzorce smo zbrali cerebrospinalne tekočine otrok do petega leta starosti, pri katerih je obstajal sum na okužbo osrednjega živčevja.

Rezultate RT-PCR v realnem času za dokaz prisotnosti RNA človeških parehovirusov s testom "Parechovirus r-geneTM" smo želeli preveriti tudi z referenčno metodo – klasično enostopenjsko RT-PCR. Predvidevali smo, da bosta obe metodi primerljivi v dokazovanju RNA HPeV. Pričakovali smo, da bo komercialni komplet "Parechovirus r-geneTM" 100-odstotno specifičen. Domnevali smo, da bo "Parechovirus r-geneTM" zadovoljil merila dobrega in ustreznega testa za rutinsko diagnostiko HPeV v vzorcih cerebrospinalne tekočine.

2. PREGLED OBJAV

Virusi so pogosti povzročitelji okužb osrednjega živčevja, ki se klinično najpogosteje izražajo kot meningitis in encefalitis. Po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije je bilo v letu 2008 prijavljenih 506 virusnih okužb osrednjega živčevja. Med njimi je bilo prijavljenih 251 primerov klopnega meningitisa, 22 primerov enterovirusnega meningitisa, 5 primerov encefalitisa in 5 primerov meningitisa po prebolenem pasavcu, 3 primeri meningitisa in encefalitisa, kjer je bil povzročitelj herpes simpleks, in en primer encefalitisa po prebolenih noricah. V ostalih 219 primerih virusnega povzročitelja niso dokazali (Poljak in Seme, 2009).

2.1. PAREHOVIRUSI

2.1.1 Zgodovinski pregled

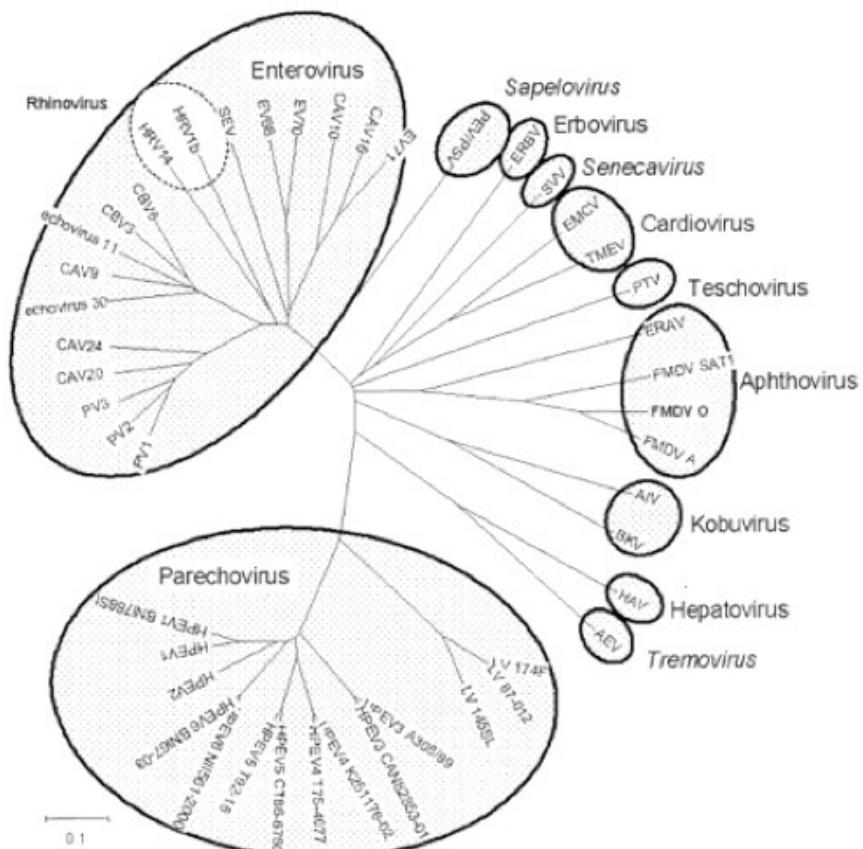
HPeV so odkrili leta 1956 v času epidemije poletne diareje v Združenih državah Amerike (Wigand, 1961). Novoodkriti virus so sprva uvrstili v rod *Enterovirus* (EV) pod imenom *Echovirus 22* in *23* (Chieochansin in sod., 2011). Razlog za tako uvrstitev je bila njihova biologija rasti v celični kulturi, ki je imela podoben citopatski efekt (angl. *cytopathic effect*, CPE) kot enterovirusi, prav tako niso okužili testnih živali (miši in opice). V primerjavi s simptomi bolezni, ki jih povzročajo EV, se je HPeV prikazal kot atipični enterovirus zaradi počasnega razvijanja CPE v okuženih celicah celične kulture in povezave z blagimi prebavnimi motnjami. Pozneje so na osnovi razlik v organizaciji in strukturi genoma, kodiranju proteinov in ostalih bioloških lastnosti HPeV reklassificirali v poseben rod *Parechovirus* in preimenovali v HPeV1 in HPeV2 (Stanway G., 1999). Skoraj pol stoletja po odkritju HPeV1 in 2 je bil na Japonskem odkrit še tretji genotip (Ito M., 2004). Po tem odkritju število genotipov HPeV po zaslugi razvoja novih molekularnih metod samo še narašča.

2.1.2 Taksonomska uvrstitev

Pikornavirusi so majhni virusi brez ovojnico, ki vsebujejo enoverižno RNA s pozitivno polarnostjo. Družina *Picornaviridae* je ena od največjih RNA virusnih družin, s številnimi patogeni, ki okužijo tako človeka kot živali. Družina *Picornaviridae* danes vključuje 12 rodov: *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Aphthovirus*, *Erbovirus*, *Teschovirus*, *Cardiovirus*, *Tremovirus*, *Sapelovirus*, *Avihepatovirus* in *Sanecavirus* (slika 1.). Med njimi so za človeka pomembni *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Hepatovirus* in *Kobuvirus*. Taksonomska razporeditev znotraj družine se je v zadnjih letih spremenjala zaradi boljših molekularnih metod in filogenetskih analiz, ki so omogočile odkritja novih tipov (Steyer in sod., 2011).

Leta 1996 so v družino *Picornaviridae* kot poseben rod uvrstili rod *Parechovirus*. Uvrstitev temelji na razlikah v molekularni in biološki strukturi. Rod *Parechovirus* vsebuje dve vrsti: človeški parehovirus (HPeV) in virus Ljungan (živalski patogen) (Picorna study group). HPeV so bili prej taksonomsko uvrščeni med enteroviruse.

Molekularne tehnike se bliskovito razvijajo in s tem tudi število novih genotipov HPeV. HPeV1 in HPeV2 so identificirali leta 1956 v času epidemije diareje v ZDA. Leta 1999 so prvič izolirali genotip HPeV3 iz vzorca blata enoletne deklice na Japonskem. Kmalu po odkritju HPeV3 so na Nizozemskem dokazali še genotip HPeV4. Genotip HPeV5 so odkrili v vzorcih, zbranih v času vročinske epidemije v letih od 1973 do 1992 v ZDA. Leta 2007 so odkrili HPeV6, po tem pa število novih genotipov samo še narašča (Harvala in Simmonds, 2009). HPeV do danes zajema 16 genotipov (HPeV1–16) (Chieochansin in sod., 2011).



Slika 1: Prikaz taksonomske razvrstitev družine *Picornaviridae* (Stanway in Hyypiä, 1999)

2.1.3 Molekularne značilnosti

HPeV ima enoverižno pozitivno polarno RNA. Genom je dolg okrog 7300 nukleotidov in ima značilno organizacijo pikornavirusov (Stanway in Hyypiä, 1999), ki se vidi na sliki 2.

V 700 nukleotidov dolgem 5' nekodirajočem koncu (angl. *untranslated region*, UTR) leži 2200 kodonov velik odprt bralni okvir (angl. *open reading frame*). Na 5' UTR je vezana beljakovina VPg. Sledi 80 nukleotidov dolg 3' UTR in na koncu polyA rep.

5' UTR je povezan s pomnoževanjem in prevajanjem virusne RNA. Sestavlja ga 12 sekundarnih in terciarnih zank, ki se med pikornavirusi razlikujejo, zato je to področje ustrezno za taksonomsko razvrščanje pikornavirusov (Stanway in Hyypiä, 1999).

Slabo raziskan 3' UTR ima dobro ohranjeno nukleotidno zaporedje med genotipi parehovirusov. Z boljšim poznavanjem tega odseka bi bilo lažje razumeti vlogo 3' UTR pri pomnoževanju virusne RNA (Al-Sunaidi in sod., 2007).

Odprt bralni okvir v 5' UTR kodira tako strukturne proteine kapsidne proteine (VP0, VP3 in VP1), kot nekatere nestruktурne proteine (2A-2C, 3A-3D), proteinaze in polimeraze. Nestrukturni proteini so slabo raziskani, zato se o njihovi vlogi pri genomu HPeV domneva na podlagi znanih funkcij teh beljakovin pri drugih pikornavirusih (Widenbeest in sod., 2010).

Poliproteini pikornavirusov se cepijo s proteinazami, da nastanejo prekurzorske molekule za končne proteine. HPeV vsebuje eno samo tako proteinazo, 3Cpro.

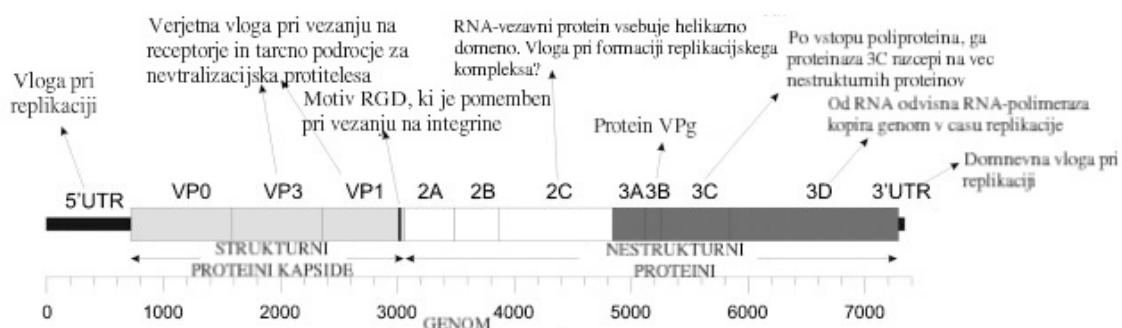
Ko vstopi virus v gostiteljsko celico, se RNA direktno prepiše v dolgi poliprotein, ki se nato s pomočjo edine virusne proteaze 3Cpro razcepi v tri strukturne proteine: VP0, VP1 in VP3. Ti trije strukturni proteini so gradniki virusne kapside in nestrukturnih proteinov (2A-2C in 3A-3D), ki so nujno potrebni za replikacijo. Za razliko od ostalih pikornavirusov se VP0 pri HPeV v nadaljevanju ne razcepi v proteina VP4 in VP2. Pri HPeV je N-terminalna regija proteina VP0 prevladujoče antigensko mesto, po čemer se razlikuje od ostalih pikornavirusov (Harvala in Simmonds, 2009).

Pri HPeV1 ima dodatno antigensko lastnost, ki izzove tudi nastajanje nevtralizirajočih protiteles, področje ki je v C-terminalni regiji kapsidnega proteina VP1 in vsebuje arginin-glicin-asparaginsko kislino (angl. *arginine-glycine-aspartic acid*, RGD).

Za čim bolj učinkovito translacijo lastne RNA večina pikornavirusov zavira primarno translacijo gostiteljske mRNA s proteinom 2A. Ne vemo ali enak proces teče tudi pri HPeV (Stanley in sod., 1994).

Za pomnoževanje virusnega genoma je odgovorna od RNA odvisna RNA-polimeraza (3Cpol), ki vključuje strukture RNA, prisotne v 5' UTR virusne RNA (Nateri in sod., 2000), zaporedje VP0 (cis-delujoči replikacijski element – CRE) (Al-Sunaidi in sod., 2007) in protein 2C (vpleten v NTP-azno aktivnost in vezavo RNA na 3' UTR) (Samuilova in sod., 2007). Po vezavi proteina VPg (ga kodira zaporedje 3B) na 5' konec RNA, se pozitivno orientirana RNA prepiše v negativno orientirano RNA, ki se lahko replicira v prejšnjo obliko, če je potrebna dodatna translacijska aktivnost ali produkcija virusnih delcev. Po koncu pomnoževanja se virusni delci sprostijo iz gostiteljskih celic.

Pri večini pikornavirusov se virus pri vstopu v gostiteljsko celico sprosti v citoplazmo s slačenjem kapside ter razcepljanjem proteina VP0 na dva proteina: VP2 in VP4. Ker do tega razcepljanja pri HPeV ne pride, še ni znan natančen proces slačenja kapside pri HPeV (Stanway in sod., 1994).



Slika 2: Organizacija zaporedij v genomu HPeV, ki kodirajo proteine (Harvala in Simmonds, 2009)

2.1.4 Patogeneza

Poleg fekalnega in oralnega prenosa se HPeV lahko prenaša tudi z respiratornimi izločki. Domneva se, da so glavna mesta pomnoževanja HPeV prebavila in dihala. Razmnoževanje HPeV v prebavilih se lahko dokaže v blatu še dolgo časa po okužbi. HPeV se tudi širijo po krvnem obtoku v ostale organe in povzročajo sistemske bolezni. S prehajanjem krvno-možganske pregrade povzročajo okužbe osrednjega živčevja (Harvala in Simmonds, 2009).

Ni znano, zakaj je genotip HPeV3 bolj kot ostali genotipi parehovirusov, povezan s sepsami pri novorojenčkih in boleznimi centralnega živčnega sistema pri otrocih. O človeškem imunskem odzivu na okužbe, povzročene s HPeV, ni veliko znanega. Kar je znanega o patogenezi, je rezultat imunoloških raziskav družine *Picornaviridae* oz. imunoloških raziskav enterovirusov. Podatkov o zaščitni vlogi nevtralizirajočih protiteles pri okužbah s HPeV ni. Nizka prevalenca protiteles proti HPeV3 pri odraslih, lahko kaže na pomanjkanje protiteles materinega izvora v prvih mesecih življenja (Benschop in sod., 2006).

Šele pred kratkim so prepoznali receptorje "toll like" (TLR) 7 in 8 kot pomembne dejavnike v prirojeni imunski obrambi proti HPeV1 (Triantafilou in sod., 2005). TLR so transmembranski proteini, ki igrajo pomembno vlogo v imunskem odzivu proti patogenim mikroorganizmom in sprožijo vnetne citokine kot odgovor na vdor bakterij ali virusov. Čeprav ni nobenih objav, predvidevamo, da so ti TLR enako pomembni tudi v obrambi pred okužbami s HPeV3. Volpe (2008) je menil, da okužba s HPeV3 povzroči znotrajcelično vezavo TLR8, ki vodi do sproščanja reaktivnega kisika in dušika ter protivnetnih citokinov iz celic mikroglia. Posledica je smrt živčnih celic. Receptorji TLR8 so prisotni v motnjah aksonov in v razvoju živčnega sistema, kar bi lahko pojasnilo, zakaj so hude okužbe s HPeV3 pri dojenčkih pogostejše, kot pri starejših otrocih in odraslih (Benschop in sod., 2008).

Samo odkritje genotipa HPeV3 v cerebrospinalni tekočini je posledično pomagalo pri odkritju razlik v virusnem tropizmu med različnimi genotipi HPeV. To se že kaže v

počasni rasti HPeV3 na omejenem številu celičnih kultur in slab produkciji CPE (Benschop in sod., 2010; Watanabe in sod., 2007). HPeV3 okuži drugačne celične kulture kot HPeV1. Rekombinacija genotipa 3 je zelo redka, medtem ko se drugi genotipi pogosteje rekombinirajo med seboj (Benschop in sod., 2008).

Razlike v virusnem tropizmu je mogoče pojasniti z razliko v delovanju receptorjev. HPeV1, HPeV2, HPeV4, HPeV5 in HPeV6 vsebujejo motiv RGD v C-terminalni regiji proteina VP1, ki ga imajo tudi nekateri drugi virusi, kot so FMDV (angl. *foot and mouth disease virus*), *Coxsackie A virus 9* in *Echovirus 9*. Motiv RGD ima vlogo pri pritrjevanju teh virusov na integrine, ki so na zunanjji strani membran celic. RGD motiv je bistvenega pomena za HPeV1 okužbe (Joki-Korpela in sod., 2001; Stanway in sod., 2000). Ker HPeV3 ne vsebuje RGD motiva, domnevajo, da okužba s HPeV3 poteka prek različnih, od RGD neodvisnih receptorjev. Slednje še ni potrjeno.

Na osnovi raziskav receptorjev različnih vrst EV je dognano, da ima nastajanje različnih receptorjev na zunanji membrani celic med razvojem organov pomembno vlogo pri opredeljevanju tropizma (Harvala in sod., 2005). Ta ugotovitev bi bila lahko v pomoč pri razlagi, zakaj so okužbe z genotipom HPeV3 redko ali nikoli dokazane pri starejših otrocih in odraslih, in bi lahko delno pojasnila tudi, zakaj so novorojenčki bolj dovetni za take okužbe.

2.1.5 Rizične skupine

Več kot 90 % infekcij s HPeV je dokazanih pri otrocih do petega leta starosti (Benschop in sod., 2010). Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organization*, WHO) je bilo v obdobju od leta 1967 do 1974 94 % okužb s HPeV1 pri otrocih, mlajših od 4 let, od katerih jih je bilo 60 % mlajših od 1 leta. Samo 1,8 % okužb je bilo dokazanih pri odraslih. Pri okužbah s HPeV3 je povprečna starost otrok 1,3 meseca in pri okužbah s HPeV1 6,6 meseca (Benschop in sod., 2006). Iz te starostne razlike lahko

sklepamo, da imajo novorojenčki slabšo imunsko zaščito proti HPeV3 kot malo starejši dojenčki in otroci.

Od 95 do 99 % novorojenčkov ima protitelesa proti HPeV1, ki so verjetno materinega izvora, kar pa ni pravilo. Test prevalence s protitelesi kaže, da pri otrocih od 6. meseca starosti do tretjega leta starosti prevalenca upada, potem pa se spet poviša do 95 %. Zato je tudi povprečna starost bolnikov, kjer je povzročitelj okužbe genotip HPeV1, 6,6 meseca (Hyytiä in sod., 1998).

Podatki o prevalenci genotipa HPeV3 so drugačni. Podatki o prevalenci protiteles proti HPeV3 za novorojenčke niso dostopni. Pri otrocih, starih od 7 do 12 mesecev, je prevalenca 15 %; v adolescentni dobi zraste do 91 % in je pri odraslih od 56 do 87 %. To je v nasprotju s podatki o HPeV1, kjer 97 % odraslih še ima protitelesa proti genomu 1. Razlog za tako nizko prevalenco protiteles proti HPeV3 je verjetno v pojavljanju tega genoma v poznih 1980 letih, kar pomeni, da cirkulacija genoma 3 po svetu še ni dovolj razširjena, da bi novorojenčki imeli protitelesa materinega izvora (Harvala in sod., 2011).

2.1.6 Klinična slika

Pred 50 leti so opisali prvo epidemijo s HPeV pri otrocih z diarejo. Do danes je bilo objavljenih veliko poročil o različnih bolezenskih stanjih, ki jih povzročajo različni genotipi HPeV. Simptomi okužb, kjer je povzročitelj HPeV, so pogosto blagi ali celo asimptomatski (Harvala in Simmonds, 2009).

Klinični simptomi okužbe s HPeV so podobni simptomom okužbe z enterovirusi. Razpon je zelo širok, od srednjih respiratornih in prebavnih bolezni do bolezni, podobnih meningitisu in sepsam. V obdobju, ko sta bila znana samo genotipa HPeV1 in HPeV2, so klinične okužbe z njima šteli za nepomembne za klinične namene. To se je spremenilo po odkritju genotipa HPeV3 (Ito in sod., 2004). Primerjava okužb pri otrocih s HPeV1 in

HPeV3 je pokazala povezavo HPeV3 s sepsom pri novorojenčkih in okužbami osrednjega živčevja ter ugotovila, da je HPeV1 povzročitelj blažjih simptomov (Benschop in sod., 2006). Te ugotovitve so pozneje podkrepile različne raziskave z dokazovanjem prisotnosti HPeV v cerebrospinalni tekočini otrok z okužbo osrednjega živčevja (kot sta npr. meningitis in encefalitis) (Harvala in sod., 2009).

Otroci, okuženi s HPeV3, pogosto kažejo simptome, kot sta izpuščaj in povišana telesna temperatura, ki jih pripisujemo znakom okužbe osrednjega živčevja. Večina (54–80 %) otrok je kazala tudi znake, podobne sepsi: povišana telesna temperatura ali hipotermija s poslabšanim delovanjem ožilja in/ali dihal, definirano kot tahikardija in bradikardija, ter nizek krvni pritisk. Dodatni simptomi so makupapulozni izpuščaj ter simptomi, povezani s prebavili in dihali (Benschop in sod., 2006; Harvala in sod., 2009).

Ostali genotipi HPeV so povezani z boleznimi srednjih prebavil in dihal pri otrocih in so pogosto odkriti kot osnovna bolezen oz. kot bolezen, ki je oslabila imunski sistem ter omogočila nastop drugih kliničnih znakov (Pajkrt in sod., 2009).

2.1.7 Epidemiologija

Večina epidemioloških raziskav je bila narejenih na vzorcih blata, ker zagotavljajo natančnejšo oceno razširjenosti posameznih genotipov HPeV.

HPeV1 je prevladujoči sev, ki povzroča okužbe pri mlajših otrocih. Epidemiološke raziskave v zadnjih tridesetih letih kažejo, da je HPeV1 najbolj razširjen genotip (Joki-Korpela & Hyypiä, 1998).

HPeV3 je drugi najpogosteji genotip. Pri 22 do 26 % vseh HPeV pozitivnih vzorcev blata, zbranih na področju Amsterdama, je povzročitelj okužb prav genotip HPeV3, čeprav je HPeV1 najpogosteje dokazan genotip v vzorcih blata (65–71 %) (Benschop in sod., 2010).

Ostale raziskave v evropskih državah in Aziji dajejo podobne rezultate (Tapia in sod., 2008; Ito in sod., 2010).

Genotip HPeV4 so dokazali le v vzorcih blata (Benschop in sod., 2010), HPeV6 pa prevladuje bolj kot respiratorni patogen (Harvala in sod., 2008). O okužbah z genotipoma 2 in 5 so poročali občasno. Epidemiološke lastnosti genotipov HPeV7–16 še niso raziskane (Benschop in sod., 2010).

Lestvica razširjenosti sevov je dokaj drugačna, če so epidemiološke raziskave narejene z vzorci cerebrospinalne tekočine. Najbolj razširjen genotip v vzorcih cerebrospinalne tekočine pri otrocih oz. novorojenčkih je HPeV3. Od 3 do 17 % teh okužb je pri otrocih kazalo znake meningitisa ali encefalitisa (Harvala in sod., 2009), kar presega odstotek okužb z virusom herpes simpleks.

V primerjavi z enterovirusnimi okužbami (14–17 % pozitivnih primerov okužb vsako poletje) je HPeV drugi najpogostejši povzročitelj virusnega meningitisa in encefalitisa. HPeV1 so zelo redko dokazali v cerebrospinalni tekočini, ostalih genotipov pa v cerebrospinalni tekočini še niso dokazali (Harvala in sod., 2011).

Okužbe s HPeV so ciklične. Pojavljajo se na 2-3 leta v poletnih mesecih. Zdi se, da je vzorec cirkulacije okužb povezan tudi z geografskimi področji. Okužbe s HPeV3 (identifikacija v vzorcih blata in možganskega likvorja) v severni Evropi se pojavljajo skoraj vsako drugo leto v poletnih mesecih (Benschop in sod., 2010).

V Španiji je ciklus okužb s HPeV3 nekoliko daljši, pojavljajo se približno na 3 leta. Vseeno je za potrditev tega vzorca ponavljanja potrebnih še več podatkov (Pineiro in sod., 2010). V Aziji, kjer so tudi HPeV3 prvotno identificirali, epidemioloških lastnosti kroženja s tem genotipom ni mogoče opisati, ker nimajo ponavlajočega se vzorca (Watanabe in sod., 2007). Na podlagi nižje stopnje evolucije in ponavlajočih se vzorcev kroženja genotipa 3 se ta genotip najverjetneje razvija v nove linije, ki so si antigensko različne. To je tudi razlog, da so epidemiološki vzorci cirkulacije tako nejasni.

Za razliko od HPeV3, se HPeV1 pojavlja vsako leto jeseni in pozimi v Evropi in Aziji. Enak vzorec ponavljanja je tudi pri genotipih 4 in 6 (Benschop in sod., 2010).

2.1.8 Diagnostika

Diagnoza virusnega meningitisa praviloma vključuje analizo cerebrospinalne tekočine. Analiza cerebrospinalne tekočine s HPeV okuženih otrok lahko pokaže rahlo povišano koncentracijo levkocitov.

Normalne vrednosti števila levkocitov se razlikujejo glede na starost in višje vrednosti levkocitov pri mlajših otrocih so nekaj povsem normalnega. Študija povprečnih vrednosti števila levkocitov pri otrocih je ugotovila višje število levkocitov pri novorojenčkih do 28 dni starosti kot pri dojenčkih, starih do 56 dni (Kestenbaum in sod., 2010).

Klasična diagnostika HPeV je še vedno izolacija s celično kulturo iz vzorcev blata, krvi, respiratornih vzorcev in cerebrospinalne tekočine. Celične kulture za dokazovanje HPeV po navadi vključujejo celice opičjih ledvic in človeških fibroblastov. Uporablajo se še druge celične linije, kot so celična linija HT29 (človeške celice adenokarcinoma na debelem črevesu), A549 (človeške celice pljučnega karcinoma), RD (celice rabdomiosarkoma). Diagnosticiranje s celično kulturo je časovno zamudna in manj občutljiva metoda, saj se HPeV razmnožuje dokaj počasi.

Različni genotipi HPeV kažejo razlike v rasti v različnih celičnih linijah, zato so potrebne vsaj tri celične linije, da se lahko trdi, da je rezultat izolacije pravilen (Benschop in sod., 2010). Celična kultura HT29 je odlična podlaga za rast HPeV1, 2 in 4–6. HPeV3 ima zahtevnejšo rast in uspeva le v nekaterih specifičnih celičnih kulturah, kot so Vero in celice opičjih ledvic LLCMK2 (Benschop in sod., 2010; Watanabe in sod., 2007). Citopatski efekt, ki ga HPeV3 proizvaja v teh celičnih kulturah, je majhen.

CPE, značilen za HPeV, je podoben CPE EV, zato je večja možnost nepravilne identifikacije, kar ni ravno ugodno za rutinsko diagnostiko. To tudi pojasnjuje izvirno taksonomsko uvrstitev HPeV kot EV (Wigand in Sabin, 1961). Za potrjevanje prisotnosti HPeV obstajata le antiseruma oz. specifična protitelesa proti virusnim antigenom, ki so na voljo le za genotip 1 in 2. Drugih antiserumov ni, ker protitelesa niso dostopna ali jih ni mogoče vzgojiti v celični kulturi (Benschop in sod., 2010).

Za izolacijo virusov iz cerebrospinalne tekočine je celična kultura manj primerna metoda, še posebno zaradi slabe detekcije pri bolnikih s simptomi meningitisa ali encefalitisa, ki imajo majhen virusni titer (10–1000 TCID₅₀/ml cerebrospinalne tekočine) (Rotbart, 2000). Primernejša metoda za detekcijo virusov v cerebrospinalni tekočini je PCR. Oba virusa, tako HPeV kot EV, lahko vzgojimo v celični kulturi. Če v eni celični kulturi vzgojimo oba virusa, ju s to metodo medsebojno ne moremo ločiti. PCR, ki je specifična za HPeV, ne omogoča zaznave EV, ker se tarčni mesti v 5' UTR obeh virusnih genomov preveč razlikujeta (Benschop in sod., 2006). Za detekcijo HPeV so razvili RT-PCR v realnem času kot hitrejšo in bolj specifično metodo, z manjšo možnostjo kontaminacije, v primerjavi z “*end point*” PCR (Nix in sod., 2008).

Določanje zaporedja nukleotidov variabilnega dela genoma v predelu VP1 omogoča opredelitev različnih genotipov HPeV. Če bi bil tarčni predel ohranjeni del genoma na 5' UTR koncu, identifikacija ne bi bila natančna, ker je ta del ohranjen med večino pikornavirusov (Harvala in sod., 2009).

Do danes je uveljavljenih že več testov PCR v realnem času za detekcijo HPeV, s katerimi lahko testiramo vzorce blata, respiratorne vzorce in CSF (Benschop in sod., 2008; Nix in sod., 2008; Tapia in sod., 2008).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Celična kultura

Za določitev analitične občutljivosti komercialnega kompleta Parechovirus r-geneTM (Argene, Verniolle, Francija) smo uporabili 10-kratne serijske razredčine celične kulture HPeV1, sev HR-11722-07. To je celična kultura genotipa HPeV1, dostopna v genomske knjižnice GenBank pod številko GQ996524. Začetni virusni titer celične kulture je log $10^{6,5}$ TCID₅₀/ml. HPeV1 so osamili c celični kulturi GMK na Oddelku za virologijo Hrvaškega nacionalnega inštituta za splošno zdravstvo v Zagrebu.

Koncentracijo celične kulture izražamo z virusnim titrom. Virusni titer (TCID₅₀) nam kaže končno količino virusa, pri kateri virusni delci povzročijo citopatski učinek pri 50 % celic v celični kulturi. Ta način izražanja koncentracije se bolj uporablja v klinične raziskovalne namene, kjer je treba določiti letalno dozo virusa.

Celično kulturo HPeV1 smo redčili v vodi brez RNaz in DNaz z dodano nosilno RNA (angl. *Carrier RNA*) (Qiagen, Hilden, Nemčija) v koncentraciji 1µg/ml. Nosilna RNA ščiti pred razgradnjijo virusne RNA.

Celično kulturo HPeV1 smo redčili v razponu koncentracij od 3162,27 TCID₅₀/ml do koncentracije 0,00003 TCID₅₀/ml. Pregled redčitev je prikazan v preglednici 1.

Vsi vzorci celične kulture so bili shranjeni pri -20 °C in redčitve pri -80 °C.

Preglednica 1: Priprava 10.kratnih redčin celične kulture HPeV v vodni raztopini z nosilno RNA

Oznaka dilucije	cc8	cc7	cc6	cc5	cc4	cc3	cc2	cc1	cc0
$\log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	$10^{3.5}$	$10^{2.5}$	$10^{1.5}$	$10^{0.5}$	$10^{-0.5}$	$10^{-1.5}$	$10^{-2.5}$	$10^{-3.5}$	$10^{-4.5}$
TCID_{50/ml}	3162,27	316,22	31,62	3,16	0,31	0,03	0,003	0,0003	0,00003

3.1.2 Vzorci cerebrospinalne tekočine

V raziskavo smo vključili 71 kliničnih vzorcev cerebrospinalne tekočine (angl. *cerebrospinal fluid*, CSF), odvzetih 71 bolnikom, ki so bili poslani v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani zaradi kliničnega suma na okužbo osrednjega živčevja pri otrocih do petega leta starosti. Vzorci so bili zbrani od leta 2009 do februarja 2012.

Za določanje klinične specifičnosti testa Parechovirus r-gene™ smo vključili 30 kliničnih vzorcev CSF. V 25 vzorceh CSF so predhodno dokazali prisotnost človeških enterovirusov, in v 5 kliničnih vzorceh CSF, prisotnost virusa herpes simpleksa (HSV-1 in/ali HSV-2). Vse vzorce so odvzeli otrokom do petega leta starosti, pri katerih je obstajal sum na virusno okužbo osrednjega živčevja.

Za določanje klinične občutljivosti testa Parechovirus r-gene™ smo v raziskavo vključili 41 kliničnih vzorcev CSF, odvzetih pri kliničnem sumu na virusno okužbo osrednjega živčevja pri otrocih do petega leta starosti, v katerih ni bila dokazana prisotnost drugih najpogostejših virusnih povzročiteljev (EV, HSV) teh okužb. Od 41 kliničnih vzorcev CSF je bilo 20/41 (49 %) vzorcev odvzeto istemu številu deklic in 21/41 (51 %) vzorcev odvzeto istemu številu dečkov. Povprečna starost bolnikov ob odvzemuh vzorca je bila eno leto in 1 mesec, najmlajši je bil star 1 dan, najstarejši pa 5 let.

Vsi vzorci CSF so bili shranjeni pri -20 °C.

3.2 METODE

Laboratorijsko delo je potekalo ob doslednem upoštevanju aseptičnih tehnik dela v laboratoriju 2. biovarnostne stopnje na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

3.2.1 Postopek osamitve RNA

3.2.1.1 Postopek ročne osamitve virusne RNA

Za postopek osamitve RNA iz kliničnih vzorcev CSF smo uporabili komercialni komplet "QIAamp® Viral RNA Mini" (Qiagen, Hilden, Nemčija). Postopek osamitve RNA smo opravili v skladu z navodili proizvajalca.

Postopek poteka pri sobni temperaturi. Sprva smo vzorce 10 min centrifugirali pri 2000 rpm v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). V 1,5 ml sterilne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 560 µl pufra AVL in mu dodali 140 µl supernatanta vzorca. Mešanico smo s pomočjo mešala v 15 sec dobro premešali. Sledila je 10-minutna inkubacija pri sobni temperaturi. Po kratkem centrifugiranju (zaradi odstranjevanja kapljic z notranje strani pokrovčka in stene mikrocentrifugirke) smo dodali 560 µl 96 % etanola, 15 sec mešali na mešalu in na kratko centrifugirali.

Nato smo 630 µl vsebine mikrocentrifugirk odpipetirali v ločevalne kolonice, vstavljenе v 2 ml zbiralne mikrocentrifugirke. Sledilo je 1-minutno centrifugiranje pri 8000 rpm. Kolonce smo prestavili v nove zbiralne mikrocentrifugirke in zbiralno mikrocentrifugirko s filtratom zavrgli. V ločevalno kolonco smo dodali preostanek mešanice. Še enkrat smo ponovili postopek centrifugiranja (1 min, 8000 rpm). Zbiralne mikrocentrifugirke z ostanki mešanice smo zavrgli, kolonce pa prestavili v nove zbiralne mikrocentrifugirke. Sledilo je spiranje kolonc s 500 µl pufra AW1 (ki je bil predhodno redčen z etanolom po navodilih proizvajalca) in centrifugiranje (1 min pri 8000 rpm). Po centrifugiranju smo zbiralne

mikrocentrifugirke spet zamenjali in v kolonco dodali 500 µl pufra AW2 (ki je bil predhodno redčen z etanolom po navodilih proizvajalca). Sledilo je 3-minutno centrifugiranje pri 14000 rpm. Kolonce smo potem prestavili v nove zbiralne mikrocentrifugirke in ponovili centrifugiranje (1 min pri 14000 rpm). S tem korakom smo odstranili ostanke etanola. Vezano RNA smo iz kolonc izprali s 60 µl pufra AVE, po predhodni 1-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi in 1-minutnem centrifugiranju pri 8000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo kolonce zavrgli, eluirano RNA pa shranili pri –20 °C v primeru takojšnje uporabe, ali pri –80 °C za daljše obdobje.

3.2.1.2 Postopek avtomatske osamitve virusne RNA

Za postopek osamitve RNA iz kliničnih vzorcev CSF, v katerih so bili dokazani enterovirusi ali virus herpes simpleksa, smo uporabili komercialni komplet “MagNA Pure Compact Nucleid Acid Isolation kit I” (Roche, Applied Science, Mannheim, Nemčija).

Komplet vsebuje kartuše z reagenti (lizirajoči pufer, magnetni delci, proteinaza K, spiralni in elucijski pufer), nastavke za pipete, epruvete za vzorce, elucijske epruvete in pokrovčke za elucijske epruvete.

Klinične vzorce CSF smo dobro premešali in jih za kratek čas centrifugirali. V 1,5 ml reakcijske mikrocentrifugirke smo dodali 200 µl vzorca. Kartuše, ki smo jih prehodno dobro zmešali, smo vstavili v napravo “MagNA Pure Compact” (Roche, Applied Science, Basel, Švica). Na ustrezena mesta smo vstavili reakcijske mikrocentrifugirke z vzorci in elucijske mikrocentrifugirke, v katerih je bil po končanem procesu eluat. Na napravi smo nastavili naslednje opcije: protokol “Total_NA_plasma_100_400”, volumen 200 µl, za elucijski volumen smo vnesli 50 µl. Po končanem postopku smo elucijske mikrocentrifugirke zaprli z zamaškom, jih ustreznno označili ter shranili pri –20 °C.

3.2.2. Verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo

Za pomnoževanje 5' nekodirajoče regije RNA HPeV, ki je visoko ohranjen gen med pikornavirusi, smo uporabili:

- komercialni komplet reagentov “Parechovirus r-geneTM” (Argene, Biomérieux, Verniolle, Francija).
- klasično enostopenjsko RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma AN345 in AN344 (Nix in sod., 2008).

3.2.2.1 Dokazovanje HPeV z RT-PCR v realnem času

Pred kratkim se je na tržišču pojavil prvi komercialni komplet reagentov za dokazovanje HPeV. Razvilo ga je podjetje Argene (Biomérieux, Verniolle, Francija) in ga poimenovalo “Parechovirus r-geneTM”. Komplet “Parechovirus r-geneTM” je pripravljen za dokazovanje RNA HPeV v respiratornih vzorcih in CSF z metodo enostopenjske PCR v realnem času z reverzno transkriptazo (RT-PCR v realnem času). Pomnoženi pridelek RT-PCR v realnem času je 265 bp dolg odsek 5' UTR genoma HPeV.

Komplet reagentov vsebuje interno kontrolo IC1, reverzno transkriptazo RT, pozitivno kontrolo PC20 in reakcijsko mešanico R20, ki vsebuje mešanico nukleotidov, MgCl₂, pufer, začetne oligonukleotide in sonde, IC1, Taq polimerazo in barvilo ROXTM.

Reverzno transkriptazo smo po navodilih proizvajalca redčili v razmerju 1 : 10. V 1,5 ml epruvetki smo pripravili reakcijsko mešanico po naslednji formuli:

$$V = n \times (0,15 \mu\text{l} \text{ reverzne transkriptaze} + 15 \mu\text{l} \text{ reakcijske mešanice}),$$

pri čemer je V skupni volumen in n število vzorcev.

V luknjico na mikrotitrski ploščici smo v 15 μl reakcijske mešanice dodali 5 μl ekstrahirane nukleinske kisline.

Pomnoževali smo z napravo "LightCycler 480[®]" (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). Prednost izvajanja PCR v realnem času na tej napravi je možnost sočasnega pomnoževanje 96 vzorcev, hitrost in majhna možnost kontaminacije.

Pogoji RT-PCR v realnem času so bili v skladu s priloženimi navodili proizvajalca komercialnega kompleta. Transkripcija virusne RNA v komplementarno DNA (cDNA) je potekala 5 min pri 50 °C, sledila je 15-minutna denaturacija pri temperaturi 95 °C. Pomnoževanje cDNA je teklo s 50-kratnim ponavljanjem naslednjih treh stopenj:

- denaturacija pri temperaturi 95 °C (10 sekund),
- prileganje začetnih oligonukleotidov pri 60 °C (40 sekund),
- podaljševanje verige pri 72 °C (25 sekund).

Merjenje fluorescenčnega signala pri valovni dolžini 465–510 nm (FAM) in zbiranje podatkov je potekalo med vsako stopnjo prilaganja/podaljševanja na t. i. »single mode« način.

Po končanem tristopenjskem ciklu je pomnoževanju sledilo 30-sekundno ohlajanje pri 40 °C.

Podatki so bili podani z avtomatsko kvantitativno analizo računalniškega programa "LightCycler480 II software version 1.5.0." naprave "LightCycler 480[®]".

Za prikaz nastalih pridelkov PCR se pri reakciji RT-PCR v realnem času uporabljajo oligonukleotidne sonde označene z fluorogeno molekulo. Sonde se specifično vežejo na tarčno zaporedje cDNA med obema začetnima oligonukleotidoma. Ko polimeraza tekom reakcije doseže hibridizirano sondu, jo zaradi 5' eksonukleazne aktivnosti razreže in s tem loči fluofor od dušilca (angl. *quencher*). Dušilec zaradi oddaljenosti ne more več sprejemati svetlobne energije fluofora in zato naprava "LightCycler 480[®]" zazna fluorescenco. Količina oddane svetlobe je sorazmerna količini razgrajene sonde, ta pa s količino tarčnih elementov. Več imamo pridelka RT-PCR v realnem času, močnejša in bolj intenzivna bo fluorescenco. Rezultati so podani v obliki amplifikacijskih krivulj

(sigmoidne krivulje) in Ct-vrednosti (angl. *cycle threshold*). Začetni pomnoženi pridelek RT-PCR v realnem času ni viden, ker je fluorescenčni signal reporterskega fluofora prešibek, da bi ga ločili od fluorescence ozadja. Nastali pridelek RT-PCR v realnem času dokažemo šele, ko njegova fluorescencija preseže fluorescenco ozadja oz. prag detekcije. To točko imenujemo Ct. Nižja kot je Ct-vrednost, več kopij tarčne RNA je bilo v vzorcu (Espy in sod., 2006).

3.2.2.2 Dokazovanje HPeV s klasično enostopenjsko RT-PCR

Za pomnoževanje RNA HPeV s klasično enostopenjsko RT-PCR smo uporabili komercialni komplet "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Nemčija), mešanico nukleotidov iz kompleta "PCR Nucleotide Mix" (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) in začetna oligonukleotida AN344 (R: 3'-GGC CCC WGR TCA GAT CCA YAG T-5') in AN345 (F: 5'-GTA ACA SWW GCC TCT GGG SCC AAA AG-3'), ki omogočata pomnoževanje 194 bp velikega dela 5' UTR konca genoma HPeV (Nix in sod., 2008).

To metodo smo uporabili kot referenčno metodo PCR, s katero smo primerjali rezultate, dobljene s kompletom "Parechovirus r-geneTM".

Reakcijska mešanica je bila pripravljena po protokolu, razvidnem iz preglednice 2. Končni volumen reakcijske mešanice je bil 20 µl mešanice kemikalij iz komercialnega kompleta, ki smo ji dodali 5 µl vzorca.

Preglednica 2: Vsebina reakcijske mešanice za dokazovanje HPeV s klasično enostopenjsko RT-PCR

Kemikalije	Volumen za 1 vzorec (µl)	Končna koncentracija
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5	1x
Mešanica nukleotidov	1	400 µM vsakega dNTP
Začetni oligonukleotid AN344 (20µM)	0,75	0,6 µM
Začetni oligonukleotid AN345 (20µM)	0,75	0,6 µM
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1	/
H ₂ O brez RNaze	11,5	/

Prepis RNA je potekal 30 minut pri temperaturi 50 °C, sledila je 15-minutna denaturacija pri 95 °C. Pomnoževanje cDNA je teklo s 40-kratnim ponavljanjem naslednjih korakov:

- 30 sekund pri 94 °C,
- 1 minuta pri 58 °C,
- 1 minuta pri 72 °C.

Na koncu sta sledila 10-minutna inkubacija pri 72 °C in zatem ohlajanje mešanice na 4 °C.

Za prepisovanje virusne RNA in pomnoževanje cDNA smo uporabili napravo “GeneAmp® PCR System 9700” (Applied Biosystems, Norwalk, ZDA).

3.2.2.2.1 Dokazovanje pridelkov PCR klasične enostopenjske RT-PCR

Pridelke PCR, dobljene s klasično enostopenjsko RT-PCR, smo preverili z gelsko elektroforezo.

Za pripravo 1,6 % agaroznega gela smo v erlenmajerico natehtali 1 g agaroze "A9539 AGAROSE for routine use" (Sigma- Aldrich, St. Louis, ZDA) in dodali 50 ml 1x pufra TAE (0,04 M Tris-HCL; 0,02 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,02 M Na-acetat pH = 8,3). Mešanico smo v mikrovalovni pečici segreli do vrelišča, da se je agarozna raztopila. Rahlo ohlajenemu tekočemu gelu smo dodali 5 µl etidijevega bromida (koncentracija 10 mg/ml) (Promega Corporation, Madison, ZDA). Etidijev bromid se vrine med dvojno vijačnico ter fluorescira pri UV-svetlobi. Pri delu s fluorescentnim barvilom, ki je mutagena snov, smo bili previdni. Uporabili smo masko za obraz in rokavice. Gel smo zatem zlili v kalup z vstavljenimi glavnički. Ko se je gel strdil, smo glavničke odstranili. Nato smo gel vstavili v elektroforezno banjico in ga prelili z na 4 °C ohlajenim pufom 1X TAE.

V prvo vdolbinico smo vstavili 3,2 µl molekularnega označevalca "50 bp" (Roche Diagnostics) in v drugo 3,2 µl molekularnega označevalca "100 bp" (Roche Diagnostics). Označevalec "50 bp" uporabljam za dokazovanje 50–750 bp, "100 bp" pa za označevanje do 1500 bp dolgih pridelkov PCR. Oba vsebujeta tudi 2642 bp dolg delec DNA.

V ostale vdolbinice v gelu smo vnesli 6 µl pridelka RT-PCR, ki smo mu predhodno dodali 1,6 µl nosilne raztopine "Loading Dye Solution" (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija).

Elektroforeza je tekla 20 minut pri napetosti 120 V. Negativno nabita nukleinska kislina je potovala v smeri od katode proti anodi zaradi ustvarjenega električnega polja. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali z napravo "BIS 303 PC" (DNR Bio-Imaging Systems, Jeruzalem, Izrael). Ustreznost pridelkov RT-PCR smo preverili s primerjavo velikosti pridelkov z velikostjo pozitivne kontrole in molekularnega označevalca.

Kot HPeV pozitivne vzorce smo opredelili vzorce s pridelki klasične enostopenjske RT-PCR velikosti 194 bp.

3.2.3 Določanje analitičnih in kliničnih lastnosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM” za dokazovanje HPeV v cerebrospinalni tekočini

Burdova (2010) je objavila članek z opisanimi kriteriji in pogoji za ovrednotenje testa. Pri določanju analitične in klinične specifičnosti ter klinične občutljivosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM” smo sledili opisanim algoritmom.

3.2.3.1 Pomnoževanje redčin celične kulture HPeV1 s komercialnim kompletom “Parechovirus r-geneTM”

S komercialnim kompleтом “Parechovirus r-geneTM” smo prvo testirali redčine celične kulture HPeV1 v razponu koncentracij od 3162,27 TCID₅₀/ml do koncentracije 0,00003 TCID₅₀/ml, da bi ugotovili katere koncentracije celične kulture HPeV1 komercialni komplet Parechovirus r-geneTM pomnožuje.

3.2.3.2 Določanje meje detekcije komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM”

Mejo detekcije (angl. *limit of detection, LOD*) komercialnega kompleta Parechovirus r-geneTM smo določili na podlagi serijskih 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1 v razponu koncentracij od 3,16 do 0,00003 TCID₅₀/ml.

Ponovljivost smo določali s testiranjem trojnikov redčin celične kulture HPeV1 v razponu koncentracij od 3,16 do 0,00003 TCID₅₀/ml, in sicer v 12 poskusih, ki smo jih izvajali v štirih dnevih.

3.2.3.3 Določanje klinične specifičnosti in preverjanje navzkrižne reaktivnosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-gene™”

Klinično specifičnost komercialnega kompleta smo določili s testiranjem 25 kliničnih vzorcev CSF, v katerih so bili dokazani enterovirusi, in 5 kliničnih vzorcev CSF, v katerih je bil dokazan virus herpes simpleks (HSV-1 in/ali HSV-2). Vsi vzorci so bili odvzeti otrokom do petega leta starosti, pri katerih je obstajal sum na virusno okužbo osrednjega živčevja.

3.2.3.4 Določanje klinične občutljivosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-gene™”

Za določanje klinične občutljivosti komercialnega kompleta smo testirali 41 kliničnih vzorcev CSF, v katerih niso bili dokazani drugi virusni (EV, HSV) povzročitelji okužb osrednjega živčevja. Vsi vzorci so bili odvzeti otrokom do petega leta starosti, pri katerih je obstajal sum na virusno okužbo osrednjega živčevja.

Vseh 41 kliničnih vzorcev CSF smo tudi preverili s klasično enostopenjsko RT-PCR.

3.2.4 Metoda neposrednega določanja nukleotidnega zaporedja

Za določitev genotipa HPeV v HPeV pozitivnih vzorcih CSF iz pridelkov PCR klasično enostopenjsko RT-PCR, pri kateri smo uporabili oligonukleotidna označevalca AN344 in AN345, smo uporabili metodo direktnega določanja nukleotidnega zaporedja.

Pred sekvenčno reakcijo smo morali pozitivne pridelke PCR očistiti, kar pomeni odstraniti nespecifične pridelke PCR, nevgrajene nukleotide, različne soli, encime in ostale neželene produkte. To smo naredili s komercialnim kompletom reagentov “QIAquick PCR purification kit” (Qiagen). Postopek čiščenja smo opravili po navodilih proizvajalca.

Enemu volumnu (19 µl) pridelka PCR smo dodali 5 volumnov pufra PB (95 µl). Mešanico smo dobro premešali. Celoten volumen reakcijske mikrocentrifugirke smo prenesli v ločevalno mikrokolono, vloženo v 2 ml zbiralno mikrocentrifugirko. Sledilo je 1-minutno centrifugiranje pri 13000 rpm v centrifugi. Ker je v ločevalni mikrokoloni silikatna membrana, so se neželeni produkti izločili skozi membrano, DNA pa je ostala vezana nanjo. Zbiralno mikrocentrifugirko s izpirkom smo zavrgli in mikrokolono prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko. Z dodatkom 750 µl pufra PE in 1-minutnim centrifugiranjem pri 13 000 rpm smo izprali neželene soli. Po centrifugiraju smo mikrokolono vstavili v novo zbiralno mikrocentrifugirko in jo še enkrat centrifugirali. S ponovljenim centrifugiranjem smo odstranili ostanke pufra PE. Zbiralno mikrocentrifugirko s izpirkom smo zavrgli. Mikrokolono smo prestavili v 1,5 ml sterilno epruvetko in dodali 25 µl elucijskega pufra EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Sledila sta enominutna inkubacija pri sobni temperaturi in enominutno centrifugiranje pri 13000 rpm. S tem smo eluirali DNA, ujeto na membrani mikrokolone. Očiščene PCR pridelke smo do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določili z elektroforezo v 1,6 % agaroznem gelu, z dodanimi 5 µl etidijevega bromida (10 mg/mL) (Promega). Postopek priprave gela je enak, kot je opisano v točki 3.2.2.2.1.

Strjeno agarozo v modelu smo položili v elektroforezno banjico in jo prelili z ohlajenim pufrom 1x TAE.

V prvo vdolbinico smo vnesli 10 µl molekularnega kvantitativnega označevalca "MassRuler™ Low Range DNA Ladder" (Fermentas), s katerim lahko določimo koncentracijo 80–1031 bp dolgim pridelkom PCR. V vsako naslednjo vdolbinico smo vnesli mešanico, pripravljeno iz 5 µl očiščenega pridelka PCR in 2 µl nanašavnega pufra 6x "MassRuler™ Loading Dye Solution" (Fermentas).

Elektroforeza je potekala 30 minut pri sobni temperaturi in napetosti 120 V. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali z napravo "BIS 303 PC" (DNR Bio-Imaging Systems).

Koncentracijo očiščenih pridelkov PCR smo določili s primerjavo intenzitete fluorescence vzorcev DNA in intenzitete fluorescence različnih fragmentov z znano koncentracijo DNA molekularnega označevalca.

Za sekvenčno reakcijo smo uporabili komercialno dostopni komplet “Big Dye® Terminator v 3.1 Cycler Sequencing Kit” (Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA) ter začetnika oligonukleotida AN344 in AN345.

Optimalna količina DNA za izvedbo sekvenčne reakcije pri velikosti pridelkov PCR do 200 bp je 1,5 ng.

10 µl sekvenčne reakcijske mešanice smo pripravili po naslednjem protokolu:

- 0,6 µl začetnega oligonukleotida,
- 2 µl 5X pufra “BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer,”
- 0,5 µl reakcijske mešanice “BigDye Terminator v3.1”;
- 1,5 ng DNA (količina dodane DNA je odvisna od koncentracije očiščenih pridelkov PCR),
- razliko do 10 µl smo dopolnili z ddH₂O.

Za sekvenčno reakcijo s posameznim začetnim oligonukleotidom smo uporabili protokol PCR, ki so ga objavili Platt in sod. (2007).

Sekvenčna reakcija s posameznim začetnim oligonukleotidom se je pričela z enominutno inkubacijo reakcijske mešanice pri 96 °C. Začetni inkubaciji je sledilo:

- 15 ponovitev temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz
 - denaturacije (10 s pri 95 °C),
 - prileganja začetnih oligonukleotidov (5 s pri 50 °C),
 - pomnoževanja DNA (75 s pri 96 °C);
- 5 ponovitev temperaturnega cikla:
 - denaturacije (10 s pri 96 °C),
 - prileganja začetnih oligonukleotidov (5 s pri 50 °C),
 - pomnoževanja DNA (90 s pri 60 °C);
- 5 ponovitev naslednjega temperaturnega cikla:
 - denaturacije (10 s pri 96 °C),
 - prileganja začetnih oligonukleotidov (5 s pri 50 °C),
 - pomnoževanja DNA (2 s pri 60 °C).

Reakcijo smo ustavili z ohladitvijo do 8 °C.

Po končanem pomnoževanju je sledilo čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije, za katero smo uporabili komercialno dostopni komplet ‐DyeEx 2.0 Spin Kit‐ (Qiagen). Čiščenje s tem kompletom temelji na gelski kromatografiji, s katero lahko medsebojno ločujemo molekule z različnimi molekulskimi masami. S tem postopkom smo odstranili dideoksinukleotide, ki se niso vgradili zaradi nizke molekulske mase in so se ujeli v pore nastalega gela.

Postopek čiščenja je tekel po navodilih proizvajalca. Pred samim postopkom smo mikrokolono rahlo premešali, odvili pokrovček za četrtno navoja zaradi možnega nastanka vakuma in odlomili spodnji del mikrokolone. Mikrokolone smo vstavili v 2 ml zbiralne mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 3 minute pri 3000 rpm. Zbiralne mikrocentrifugirke smo zavrgli in mikrokolone vstavili v 1,5 ml sterilne reakcijske mikrocentrifugirke. Na

sredino poševnega gela v mikrokoloni smo nanesli celoten volumen sekvenčne mešanice. Sledilo je triminutno centrifugiranje pri 3000 rpm. Po centrifugiraju smo mikrokolono zavrgli, ker se je DNA eluirala v reakcijsko mikrocentrifugirko. Reakcijske mikrocentrifugirke smo za 12 minut prenesli v vakuumsko centrifugo. Po sušenju DNA smo dodali 25 µl denaturacijske raztopine "Hi-Di™ Formamide" (Applied BioSystems), predhodno ogrete na sobno temperaturo. Vsebino mikrocentrifugirke smo 15 sec mešali na mešalu in jo prenesli v reakcijske mikrocentrifugirke, namenjene za PCR. Temu je sledila dvominutna denaturacija pri 95 °C. Po končani denaturaciji smo reakcijske mikrocentrifugirke za 15 minut postavili v hladni blok, ohlajen na -20 °C.

Za sekvenčno analizo smo uporabili aparatujo "3500 Dx Genetic Analyzer" (Applied BioSystems) za avtomatsko določanje nukleotidnega zaporedja.

Dobljena nukleotidna zaporedja smo pregledali s pomočjo programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (Ibis Biosciences, Carlsbad, ZDA). Kot rezultat smo dobili elektroferogram s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem.

Z računalniškim paketom "Vector NTI Advance v10.1.1" (Invitrogen, Carlsbad, ZDA) smo ta zaporedja analizirali. Končno zaporedje pridelka PCR smo sestavili z usklajevanjem komplementarnih zaporedij.

Usklajenemu zaporedju smo s prosto dostopnim spletnim orodjem BLAST (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*) poiskali podobna zaporedja v genski banki NCBI (angl. *National Center for Biotechnology Information*). Na podlagi primerjave genotipov smo določili genotipe naših pridelkov PCR. Kot enake genotipe HPeV smo opredelili samo tiste vzorce, ki so imeli $\geq 95\%$ ujemanja z referenčnim genotipom HPeV v genski banki NCBI.

4. REZULTATI

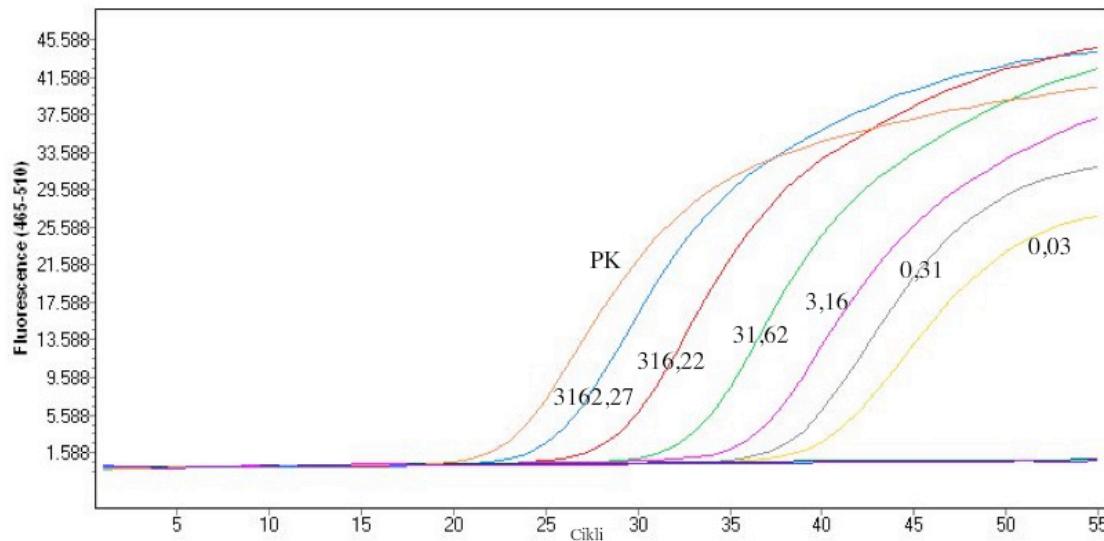
4.1 REZULTATI POMNOŽEVANJE REDČIN CELIČNE KULTURE HPEV1 S KOMERCIJALNIM KOMPLETOM “PARECHOVIRUS R-GENE™”

S komerzialnim kompletom “Parechovirus r-gene™” smo testirali 10-kratne redčine celične kulture HPeV1 v razponu koncentracij od 3162,27 TCID₅₀/ml do koncentracije 0,00003 TCID₅₀/ml. “Parechovirus r-gene™” je pomnožil koncentracije celične kulture HPeV1 v razponu od 3162,27 TCID₅₀/ml do 0,03 TCID₅₀/ml. Koncentracije nižje od 0,03 TCID₅₀/ml test “Parechovirus r-gene™” ni pomnožil (slika 3).

Test “Parechovirus r-gene™” je najvišjo koncentracijo 3162,27 TCID₅₀/ml celične kulture HPeV1 pomnožil pri vrednosti Ct 25,53 in koncentracijo 0,03 TCID₅₀/ml pomnožil pri vrednosti Ct 40,17. Dobljeni rezultati s testiranjem 10-kratnih redčitev celične kulture HPeV1 s “Parechovirus r-gene™”, ki so podani z Ct-vrednosti so izraženi v preglednici 3.

Preglednica 3: Rezultati pomnoževanje 10-kratnih redčin celične kulture HPeV1 s komerzialnim kompletom “Parechovirus r-gene™”. Legenda: / - ni rezultata

Oznaka redčine	cc8	cc7	cc6	cc5	cc4	cc3	cc2	cc1	cc0
Koncentracija (TCID ₅₀ /ml)	3162,27	316,22	31,62	3,16	0,31	0,03	0,003	0,0003	0,00003
“Parechovirus r-gene™” (Ct vrednost)	25,53	28,95	32,97	36,23	38,54	40,17	/	/	/



Slika 3: Amplifikacijske krivulje testa "Parechovirus r-gene™" z 10-kratno dilucijo celične kulture HPeV1, sev HR-11722-07. Koncentracije so izražene v TCID₅₀/ml.
Legenda: PK – Argene pozitivna kontrola PC20.

4.2 REZULTATI DOLOČANJA ANALITIČNE OBČUTLJIVOSTI KOMERCIALNEGA KOMPLETA "PARECHOVIRUS R-GENE™"

Analitično občutljivost komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™" smo določili s testiranjem 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1 v koncentracijah od 3,16 do 0,00003 TCID₅₀/ml.

Vsako testiranje je bilo izvedeno v enakih pogojih (isti komercialni komplet, na isti napravi "LightCycler 480®" (Roche), v istem laboratoriju, isti izvajalec poskusa, v dopoldanskem času). Za določitev meje detekcije, smo uporabili samo nižje razredčine celične kulture v razponu koncentracij od 3,16 do 0,00003 TCID₅₀/ml. Rezultati so prikazani v preglednici 4.

Mejo detekcije določa najnižja koncentracija vzorca v analizi, ki jo je mogoče zaznati s $\geq 95\%$ ponovljivostjo. Mejo detekcije smo določili pri koncentraciji $3.16 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$. Ponovljivost je $100\% (12/12)$. Povprečna Ct-vrednost je bila 36,79.

Podrobnejši rezultati so podani v prilogi A.

Preglednica 4: Rezultati določanja analitične občutljivosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM” s testiranjem 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1

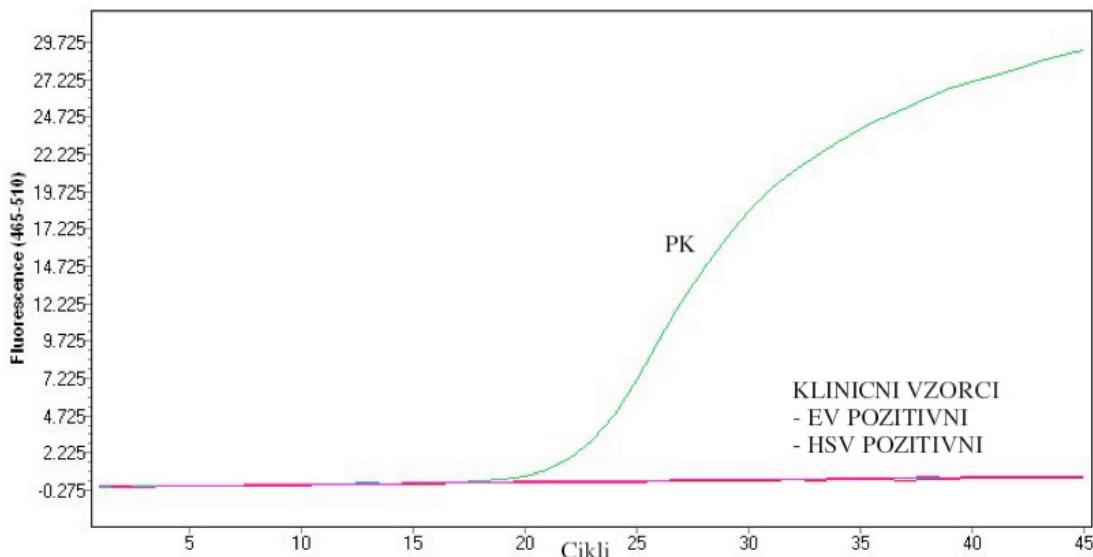
Oznaka	cc5	cc4	cc3	cc2	cc1	cc0
Koncentracija $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$	3,16	0,31	0,03	0,003	0,0003	0,00003
Št. pozitivnih rezultatov/ št. testiranih	12/12	7/12	3/12	0/12	0/12	1/12
Ponovljivost	100 %	50 %	25 %	0 %	0 %	0 %
Povrečna Ct vrednost	36,79	39,25	39,71	0	0	0

4.3 DOLOČANJE KLINIČNE SPECIFIČNOSTI IN PREVERJANJE NAVZKRIŽNE REAKTIVNOSTI KOMERCIALNEGA KOMPLETA “PARECHOVIRUS R-GENETM”

Za dokazovanje specifičnosti in navzkrižne reaktivnosti komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM” smo izbrali 30 kliničnih vzorcev CSF, pri katerih je bila dokazana prisotnost drugih virusnih povzročiteljev okužb osrednjega živčevja.

V 25 vzorcih CSF je bila dokazana prisotnost enterovirusa in v 5 vzorcih CSF je bil dokazan virus herpes simpleks (HSV1 in/ali HSV2). Vsi vzorci so bili odvzeti preiskovancem do petega leta starosti.

Vsi rezultati testiranja 30 vzorcev CSF v katerih so bili dokazani drugi povzročitelji okužb osrednjega živčevja z RT-PCR v realnem času, pri čemer smo uporabili komercialni komplet "Parechovirus r-gene™", so bili negativni. Specifičnost komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™" je bila 100 % in ni prišlo do navzkrižnega pomnoževanja delov genoma drugih virusnih povzročiteljev (EV, HSV) okužb osrednjega živčnega sistema (slika4).



Slika 4: Rezultat poskusa dokazovanja klinične specifičnosti komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™".

Legenda: PK – pozitivna kontrola, EV – enterovirus, HSV – človeški virus herpes simpleks.

4.4 DOLOČANJE KLINIČNE OBČUTLJIVOSTI KOMERCIALNEGA KOMPLETA

4.4.1 Značilnosti vzorcev in preiskovancev

V raziskavo smo vključili 41 kliničnih vzorcev CSF, ki so bili poslani v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani zaradi suma na virusno okužbo osrednjega živčevja. V teh vzorcih niso dokazali prisotnost drugih najpogostejših virusnih povzročiteljev (EV,HSV) teh okužb.

Preiskovance smo razvrstili v tri starostne skupine: 20/41 (49 %) preiskovancev je bilo starih do pol leta, 4/41 (10 %) otrok je bilo starih med 6 in 12 mesecev in 17/41 (41 %) otrok je bilo starih med 1 in 5 letom. Najmlajši preiskovanec je bil ob odvzemuh vzorca star 1 dan, najstarejši pa 5 let. Povprečna starost preiskovancev je eno leto in 1 mesec. Razporeditev po spolu je skoraj enakomerna: 20/41 (49 %) je bilo deklic in 21/41 (51 %) je bilo dečkov.

4.4.2 Dokazovanje HPeV v kliničnih vzorcih CSF z “Parechovirus r-gene™”

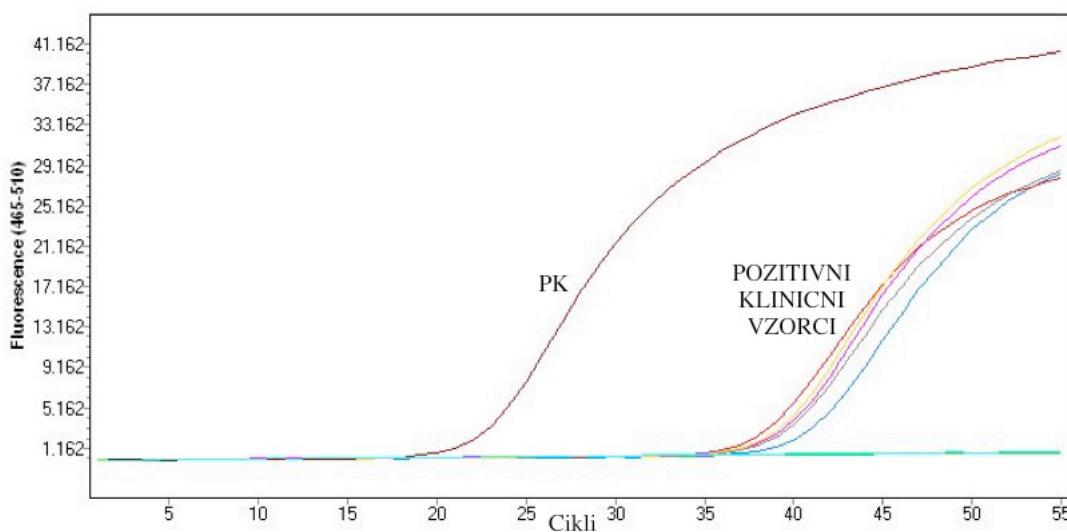
S komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene™”, ki temelji na pomnoževanju RNA HPeV z RT-PCR v realnem času smo prisotnost HPeV dokazali v 6/41 (15 %) kliničnih vzorcih CSF (slika 5.).

Vseh 6 HPeV pozitivnih vzorcev CSF, odvzetih 6 bolnikom (3 deklice, 3 dečki), pripada preiskovancem v prvi starostni skupini (do pol leta starosti). Vsi preiskovanci so bili ob dnevu odvzema vzorca mlajši od 1 meseca. Najstarejši preiskovanec je bil star 27 dni in najmlajši 8 dni. Povprečna starost preiskovancev je bila 17 dni.

V 35/41 (85 %) vzorcih CSF s komercialnim kompletom "Parechovirus r-geneTM" nismo dokazali RNA HPeV. Rezultati pomnoževanja RNA HPeV v 41 kliničnih vzorcih s komercialnim komplemom "Parechovirus r-geneTM" so podani v prilogi B. Ct-vrednosti testa 6 vzorcev CSF v katerih smo dokazali prisotnost HPeV s testom "Parechovirus r-geneTM", so prikazane v preglednici 5.

Preglednica 5: Oznaka vzorca, spol, starost preiskovancev in Ct-vrednosti RT-PCR v realnem času s komercialnim komplemom "Parechovirus r-geneTM" v HPeV pozitivnih kliničnih vzorcih CSF

Oznaka vzorca	Spol	Starost	"Parechovirus r-gene TM " (Ct-vrednost)
10814/09	M	22 dni	POZ (40,77)
14640/09	Ž	27 dni	POZ (38,25)
10937/09	M	17 dni	POZ (39,47)
13090/09	M	14 dni	POZ (39,49)
11838/09	Ž	8 dni	POZ (39,12)
18885/11	Ž	14 dni	POZ (> 40,00)



Slika 5: Amplifikacijske krivulje pozitivnih kliničnih vzorcev CSF, pridobljenih z RT- PCR v realnem času s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene™”
Legenda: PK- Argene pozitivna kontrola PC20.

4.4.3 Dokazovanje HPeV v kliničnih vzorcih CSF s klasično enostopenjsko RT-PCR

Vseh 41 kliničnih vzorcev CSF, ki smo jih testirali s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene™”, smo testirali tudi s klasično enostopenjsko RT-PCR. Z enostopenjsko RT-PCR je 6/41 (15 %) kliničnih vzorcev CSF bilo HPeV pozitivnih in 35/41 (85 %) HPeV negativnih. Rezultati dokazovanja HPeV v 41 kliničnih vzorcih CSF z enostopenjsko RT-PCR so prikazani v prilogi B.

4.4.4 Primerjava rezultatov testa “Parechovirus r-gene™” in klasične enostopenjske RT-PCR

Rezultati dobljeni z RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene™” in klasično enostopenjsko RT-PCR so bili identični. Z obema metodama smo dokazali prisotnost HPeV v istih vzorcih.

4.4.5 Določitev nukleotidnega zaporedja

Za določanje genotipa HPeV v HPeV pozitivnih kliničnih vzorcih CSF smo s klasično enostopenjsko RT-PCR pomnožili 194 bp dolg odsek genoma HPeV v predelu 5'UTR.

S primerjavo nukleotidnega zaporedja z že znanimi zaporedji HPeV v genski banki NCBI, smo v vseh 6 HPeV pozitivnih vzorcih CSF dokazali genotip HPeV3.

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Človeški parehovirusi so povezani s širokim spektrom okužb, od blagih okužb dihal in prebavil ter miokarditisa, do okužb osrednjega živčevja, kot sta meningitis ali encefalitis. Verjetnost okužbe s HPeV s starostjo upada (Benschop in sod., 2010).

Prvotno so HPeV dokazovali z osamitvijo v celičnih kulturah. Ta metoda ni zanesljiva, predvsem pa je zelo zamudna in ni najbolj primerna za diagnostiko. Poleg tega pa za vse serotipe HPeV ni na voljo nevtralizirajočih protiteles (Harvala in sod., 2010).

Nove raziskave kažejo široko geografsko razširjenost okužb s HPeV. Zaradi povečevanja razširjenosti HPeV so se pojavile potrebe po hitrem in specifičnem dokazovanju HPeV. Najbolj razširjena metoda je RT-PCR v realnem času, ki je občutljiva in specifična. Rezultate lahko odčitamo v le nekaj urah. Uporaba molekularnih metod je omogočila odkritje v preteklosti neznanih genotipov HPeV in raziskovanje genetske variabilnosti HPeV.

Uporaba molekularnih metod je omogočila boljši vpogled v patogenezo okužb s HPeV in spremljanje epidemiološkega kroženja virusa. Vse več je objav o različnih metodah dokazovanja HPeV, najpogostejsa je še vedno RT-PCR (Nix in sod., 2010). Za dokazovanje HPeV lahko uporabimo vzorce blata, respiratorne vzorce ter cerebrospinalno tekočino. Izbor kužnine je odvisen od simptomov bolezenskega stanja.

Čeprav se o okužbah s HPeV vse več govori, se s to problematiko ukvarjajo le redki diagnostični laboratorijski (Harvala in sod., 2008).

Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, se že dlje časa ukvarja s problematiko diagnostike HPeV v vzorcih cerebrospinalne tekočine pri kliničnem sumu na virusno

okužbo osrednjega živčevja. Na tržišču se je pojavil komercialni komplet "Parechovirus r-gene™" (Argene, Verniolle, Francija). Je preprost za uporabo in hiter, kar je v diagnostiki velika prednost, predvsem v diagnostiki okužb osrednjega živčnega sistema. Kompatibilen je z napravo "LightCycler 480®" (Roche Applied Science).

Namen diplomske naloge je bil preveriti analitično in klinično občutljivost ter klinično specifičnost komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™" za dokazovanje HPeV v kliničnih vzorcih CSF.

S testom "Parechovirus r-gene™" smo pomnožili 10-kratne razredčine celične kulture v razponu koncentracij od 3162,27 do 0,0003 TCID₅₀/ml. Najnižja koncentracija, ki jo je test "Parechovirus r-gene™" pomnožil, je bila določena pri koncentraciji 0,03 TCID₅₀/ml z 25 % ponovljivostjo.

Analitična občutljivost testa je definirana kot sposobnost testa, da zazna zelo nizke koncentracije tarčnega elementa v bioloških vzorcih. Analitična občutljivost testa se enači z mejo detekcije (LOD). LOD je najnižja koncentracija, ki jo test zazna v $\geq 95\%$ vzorcev (Burd, 2010). Za določanje LOD testa "Parechovirus r-gene™" smo uporabili 10-kratne serijske razredčine celične kulture HPeV1. Testirali smo razredčine koncentracije v rasponu od 3,16 do 0,0003 TCID₅₀/ml v dvanajstih reakcijah RT-PCR v realnem času v enakih pogojih. LOD testa "Parechovirus r-gene™" smo določili pri koncentraciji 3,16 TCID₅₀/ml celične kulture HPeV1 s 100 % ponovljivostjo.

V raziskavi, kjer so primerjali občutljivost dveh različnih metod RT-PCR v realnem času za dokazovanje virusov H1N1 in H5N1, so določili mejo občutljivosti 0,2 TCID₅₀/reakcijo (Kang in sod., 2010). Pri podobni raziskavi, kjer so testirali občutljivost testa za dokazovanje različnih antigenov pri gripi H1N1, so dobili naslednje meje detekcije: 3,5; 3,1; 3,8 in 2,8 TCID₅₀/ml (Chan in sod., 2009). Čeprav naslednja raziskava ni bila narejena za dokazovanje človeškega virusa, ampak virusa BRSV (angl. *Bovine respiratory syncytial virus*), ki okuži goveda, so tudi pri njej določali občutljivost testa z virusnim titrom. Določili so mejo 5 TCID₅₀/ml (Larsen in sod., 1999). Nadalje je izolacija virusov iz CSF s pomočjo celične kulture neprimerna metoda zaradi zamudnosti in pri bolnikih s simptomi

meningitisa ali encefalitisa, je virusni titer nizek (10–1000 TCID₅₀/ml CSF), zato so rezultati slabi. (Rotbart, 2000). Po predhodnih navedenih raziskavah, čeprav so bile nekatere narejene z različnimi vrstami PCR za dokazovanje virusov, ki niso sorodni HPeV in v primerjavi z osamitvijo v celični kulturi, lahko sklepamo, da je test “Parechovirus r-gene™” z mejo detekcije, določeno pri koncentraciji 3,16 TCID₅₀/ml zadovoljiv za dokazovanje okužb HPeV v vzorcih CSF.

Pred kratkim so Mirand in sod. (2012) v raziskavi primerjali občutljivost RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene™” in klasično RT-PCR, ki so ga razvili v njihovem laboratoriju. Testirali so redčine virusov HPeV1 in HPeV2 v koncentracijah od 10⁻¹ do 10⁻⁸ kopij virusnega genoma/ml. RT-PCR v realnem času je bila bolj občutljiva metoda kot klasična RT-PCR, a razlike niso velike.

V raziskavo smo vključili 71 vzorcev CSF, ki so bili poslani v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitsov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, zaradi kliničnega suma na okužbo osrednjega živčevja. Vsi vzorci so bili odvzeti otrokom do petega leta starosti.

V 41 kliničnih vzorcih CSF niso dokazali prisotnost drugih virusnih povzročiteljev teh okužb, zato smo sklepali na možnost prisotnosti HPeV. S kompletom “Parechovirus r-gene™” smo dokazali prisotnost HPeV v 15 % vzorcev (6/41).

Vse vzorce smo testirali tudi s klasično enostopenjsko RT-PCR. S tem testom smo potrdili pozitivne rezultate, dobljene z komercialnim kompletom “Parechovirus r-gene™”.

Z določanjem nukleotidnega zaporedja smo v vseh pozitivnih vzorcih dokazali genotip HPeV3. Ta genotip je najbolj razširjen genotip, opisan v epidemioloških raziskavah, narejenih na vzorcih CSF (Harvala in sod., 2009). Vsi preiskovanci, ki so bili HPeV pozitivni, so bili ob dnevu odvzema vzorca mlajši od 1 meseca. Najstarejši preiskovanec je bil star 27 dni, najmlajši 8 dni. Povprečna starost preiskovancev je bila 17 dni.

Tri HPeV pozitivna klinična vzorca CSF so odvzeli v juliju 2009, 2 v septembru 2009 ter 1 v oktobru 2011. Čeprav nimamo dovolj velikega števila vzorcev, da bi lahko govorili o epidemiologiji, lahko iz teh podatkov vseeno razberemo nekatere epidemiološke vzorce genotipa HPeV3, kot je pogostejše pojavljanje v poletnih mesecih vsako drugo leto (Harvala in Simmonds, 2009, Fujs Komloš in Poljak, 2010).

Mirand in sod. (2012) so komercialni komplet "Parechovirus r-gene™" preizkušali na 100 vzorceh CSF. Vzorci CSF so bili odvzeti preiskovancem starim od 1 dneva do 76,5 leta starosti. Dokazali so RNA HPeV v 4/100 vzorcev CSF. Od 100 vzorcev CSF je 26 vzorcev CSF bilo odvzeto otrokom do petega leta starosti. Dokazali so RNA HPeV v 3/26 vzorceh CSF odvzetih otrokom do petega leta starosti. V teh treh pozitivnih vzorceh HPeV, odvzetih otrokom do petega leta starosti, so dokazali prisotnost genotipa HPeV3. HPeV pozitivni vzorci so bili odvzeti v poletnem obdobju (od junija do avgusta) bolnikom do 4. meseca starosti. Rezultati te študije so podobni našim.

Klinična specifičnost je parameter, ki se nanaša na sposobnost zaznave izključno tarčnega elementa in na odsotnost navzkrižne reaktivnosti s podobnimi elementi (Burd, 2010). Za testiranje klinične specifičnosti komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™" smo zbrali vzorce CSF, v katerih so bili dokazani človeški enterovirusi (25 vzorcev) in virus herpes simpleks (5 vzorcev). Oba virusa sta najpogostejša povzročitelja okužb osrednjega živčevja (Steyer in sod., 2011).

S 30 vzorci CSF, v katerih je bila dokazana prisotnost drugih virusnih povzročiteljev okužb osrednjega živčevja, smo testirali klinično specifičnost komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™". Rezultati testiranja klinične specifičnosti komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™", so bili negativni. S tem smo dokazali, da je "Parechovirus r-gene™" specifičen ter da ne pride do navzkrižnega pomnoževanja delov genoma drugih virusnih povzročiteljev (EV, HSV) okužb osrednjega živčnega sistema.

S hitro in zanesljivo diagnostiko HPeV v vzorceh CSF se bo čas zdravljenja bolnikov bistveno skrajšal, zmanjšala se bo poraba antibiotikov in s tem se bodo znižali stroški,

povezani z obravnavo bolnika z virusno okužbo osrednjega živčevja (Fujs Komloš in Poljak, 2010).

Komercialni komplet reagentov "Parechovirus r-geneTM" (Argene, Verniolle, Francija) za detekcijo HPeV je preprost za uporabo in v kombinaciji z RT-PCR v realnem času omogoča rezultate poskusa v razmeroma kratkem času. Njegova analitična in klinična specifičnost ter klinična občutljivost ustrezajo Burdevim (2010) merilom dobrega testa. Ugotovili smo, da je komplet "Parechovirus r-geneTM" hiter, zanesljiv in ustrezen test za rutinsko diagnostiko dokazovanja HPeV v vzorcih cerebrospinalne tekočine.

5.2 SKLEPI

- Mejo detekcije komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM” smo določili pri koncentraciji 3,16 TCID₅₀/ml s testiranjem 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1, s 100 % ponovljivostjo.
- Dokazali smo 100 % specifičnost komercialnega kompleta “Parechovirus r-geneTM” za HPeV s testiranjem 30 kliničnih vzorcev, v katerih so bili dokazani drugi virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja (EV, HSV). Do navzkrižnega pomnoževanja drugih povzročiteljev okužb osrednjega živčevja (EV, HSV) ni prišlo.
- Z 41 vzorci CSF, ki so bili odvzeti otrokom do petega leta starosti pri sumu na virusno okužbo osrednjega živčevja in v katerih niso bili dokazani drugi virusni povzročitelji teh okužb, smo testirali klinično občutljivost komercialnega kompleta reagentov “Parechovirus r-geneTM”. Dokazali smo RNA HPeV v šestih vzorcih. Rezultate dobljene s kompletom “Parechovirus r-geneTM” smo primerjali z rezultati dobljenimi z referenčno metodo dokazovanja HPeV s klasično enostopenjsko RT-PCR . Z obema metodama smo dobili enake rezultate.
- Z metodo določanja nukleotidnega zaporedja smo v vseh šest pozitivnih vzorcih CSF dokazali genotip HPeV3. Čas odvzema pozitivnih vzorcev potrjuje pogostejše pojavljanje HPeV3 v poletnem času in pojavljanje vsako drugo leto. Povprečna starost preiskovancev, ki je bila 17 dni, potrjuje najpogostejše pojavljanje genotipa HPeV3 v vzorcih CSF pri novorojenčkih.
- Komercialni komplet reagentov “Parechovirus r-geneTM” za detekcijo HPeV je preprost za uporabo in v kombinaciji z RT-PCR v realnem času omogoča rezultate v razmeroma kratkem času. Njegova analitična in klinična specifičnost ter klinična občutljivost ustrezajo Burdevim (2010) merilom dobrega testa. Test “Parechovirus r-geneTM” je ustrezen za rutinsko diagnostično dokazovanje HPeV v vzorcih CSF.

6. POVZETEK

Človeški parehovirusi so majhni RNA virusi brez ovojnico, ki spadajo med pikornaviruse. Aseptični meningitis, encefalitis, neonatalna sepsa, miokarditis, limfadenitis, miositis, asimptotske okužbe ter bolezni dihal in prebavil so najpogosteji bolezenski znaki, ki jih kaže 16 genotipov HPeV. Najpogosteje se pojavlja genotip 1 v vzorcih respiratornega sistema, ki povzroča blažje oblike pri otrocih, najpogosteje starih okrog pol leta. V zadnjem času se vse več poroča o genotipu 3, ki so ga najpogosteje dokazali v vzorcih cerebrospinalne tekočine. Najpogosteje povzroča težje okužbe osrednjega živčevja pri otrocih do 3. meseca starosti. Razlike v patogenezi med genotipi HPeV so zaradi različnega virusnega tropizma različnih genotipov. Vsi genotipi imajo podobne biološke in epidemiološke značilnosti. Čeprav je razvoj molekularnih metod veliko prispeval k razumevanju virusov in z njimi povezanih okužb, je vseeno zelo malo znanega o številnih genotipi HPeV. Najbolj raziskana sta ravno genotipa 1 in 3. Zdravljenje okužb s HPeV še ni znano.

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, ali je komercialni komplet "Parechovirus r-gene™" primeren za rutinsko diagnostiko parehovirusnih okužb v vzorcih CSF.

V raziskavo smo vključili vzorce cerebrospinalne tekočine otrok do petega leta starosti, pri katerih je obstajal sum na virusno okužbo osrednjega živčevja.

Eden od pomembnih parametrov dobrega testa je tudi zaznava zelo nizkih koncentracij tarčnega elementa. Za določanje meje detekcije komercialnega kompleta "Parechovirus r-gene™" smo uporabili 10-kratne serijske razredčine celične kulture HPeV1, sev HR-11722-07 v koncentracijah od 3,16 do 0,00003 TCID₅₀/ml. S 100 % ponovljivostjo je meja detekcije bila določena pri koncentraciji 3,16 TCID₅₀/ml.

Prav tako smo želeli določiti specifičnost komercialnega kompleta reagentov "Parechovirus r-gene™" za HPeV; kot dokaz specifičnosti smo preverili navzkrižno pomnoževanje z drugimi virusnimi povzročitelji okužb osrednjega živčevja. RT-PCR v

realnem času s komercialnim kompletom “Parechovirus r-geneTM” je pokazal 100 % specifičnost za HPeV v kliničnih vzorcih CSF.

Z metodo RT-PCR v realnem času smo RNA HPeV dokazali v 15 % (6/41) kliničnih vzorcev CSF, pri katerih ni bilo dokaza o prisotnosti drugih povzročiteljev okužb osrednjega živčevja. Te rezultate smo potrdili tudi s klasično enostopenjsko RT-PCR. Z določanjem nukleotidnega zaporedja smo dokazali genotip 3 pri vseh šestih pozitivnih vzorcih.

Uporaba molekularnih metod pri dokazovanju okužb s parehovirusi je neprecenljiva. Seveda pa so še potrebne nadaljnje raziskave, da bi izboljšali razumevanje bioloških in epidemioloških značilnosti parehovirusov ter okužb, povezanih z njimi.

7. VIRI

- Al-Sunaidi M., Williams C. H., Hughes P.J., Schnurr D.P., Stanway G. 2007. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus typer and the identification of RNA structural domains. *Journal of Virology*, 81, 2: 1013–1021
- Bennet S., Harvala H., Witteveldt J., McWilliam Leitch E.C., McLeish N., Templeton K., Gunson R., Carman W.F., Simmonds P. 2011. Rapid simultaneous detection of enterovirus and parechovirus RNAs in clinical samples by one-step real-time reverse transcription-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 7: 2620–2624
- Benschop K.S.M., Schinkel J., Minnaar R.P., Pajkrt D., Spanjerberg L., Kraakman H.C., Berkhout B., Zaaijer H.L., Beld M.G.H.M., Wolthers K.C. 2006. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 2: 204–210
- Benschop K., Molenkamp R., van der Ham A., Wolthers K., Beld M. 2008. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*, 41: 69–74
- Benschop K., Thomas X., Serpenti C., Molenkamp R., Wolthers K. 2008. High prevalence of human parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 46, 12: 3965–3970
- Benshop K. S. M., Williams C. H., Wolthers K. C., Stanway G., Simmonds P. 2008. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *Journal of General Virology*, 89, 4: 1030–1035

Benschop K., Minnaar R., Koen G., van Eijk H., Dijkman K., Westerhuis B., Molenkamp R., Wolthers K. 2010. Detection of human enterovirus and human parechovirus (HPeV) genotypes from clinical stool samples: polymerase chain reaction and direct molecular typing, culture characteristics, and serotyping. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68, 2: 166–173

Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 1998. Javetz, Melnick & Adelberg's Medical microbiology. 21st edition. Norwalk, Appleton & Lange: 740str

Burd E.M. 2010. Validation of laboratory-develop molecular assays for infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 3: 550–576

Chan K.H., Lai S.T., Poon L.L.M., Guan Y., Yuen K.Y., Peiris J.S.M. 2009. Analytical sensitivity of rapid influenza antigen detection tests for swine-origine influenza virus (H1N1). *Journal of Clinical Virology*, 45: 205–207

Chen B.C., Cheng M.F., Huang T.S., Liu Y.C., Tang C.W., Chen C.S., Chen T.S. 2009. Detection and identification of human parechoviruses from clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65: 254–260

Chieochansin T., Vichiwattana P., Korkong S., Theamboonlers A., Poovorawan Y. 2011. Molecular epidemiology, genome characterization, and recombination event of human parechovirus. *Virology*, 421, 2: 159–166

De Vries M., Pyrc K., Berkhout R., Vermeulen-Oost W., Dijkman R., Jebbink M. F., Bruisten S., Berkhout B., van der Hoek L. 2008. Human type 1, 3, 4, 5 and 6 detection in picornavirus cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 2: 759–762

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalker S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yoo J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R., Smith T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: Application for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 165-256

Faria N. R., de Vries M., van Hemert F. J., Benschop K., van der Hoek L. 2009. Rooting human parechoviruses evolution in time. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 9: 164–172

Fujs Komloš K., Poljak M. 2010. Novi parehovirusi in enterovirusi. V: 1. Likarjev simpozij: novosti v medicinski virologiji, zbornik izročkov, Ljubljana, 11. junij 2010. Ljubljana, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe, Slovensko zdravniško društvo: 121–127

Harvala H., Kalimo H., Bergelson J. Stanway G., Hyypiä T. 2005. Tissue tropism of recombinant coxsackieviruses in an adult mouse model. *Journal of general virology*, 86, 7: 1897–1907

Harvala H., Robertson I., McWilliam Leitch E.C., Benschop K., Wolthers K.C., Templeton K., Simmonds P. 2008. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 10: 3446–3453

Harvala H., Robertson I., Chieochansin T., McWilliam Leitch E.C., Templeton K., Simmonds P. 2009. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. *Journal of Infectious Diseases*, 199, 12: 1753–1760

Harvala H., Simmonds P. 2009. Human parechoviruses: Biology, epidemiology and clinical significance. *Journal of Clinical Virology*, 45, 1: 1–9

Harvala H., Wolthers K. C., Simmonds P. 2010. Parechoviruses in children: Understanding a new infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23, 3: 224–230

Harvala H., Mcleish N., Kondracka J., McIntyre C. L., McWilliam Leitch E. C., Templeton K., Simmonds P. 2011. Comparison od human parechovirus and enterovirus detection frequencies in cerebrospinal fluid samples collected over 5-year period in Edinburgh: HPeV type 3 identified as most common picornavirus type. *Journal of Medical Virology*, 83: 889–896

Hyypiä T., Horsnell C., Maaronen M., Khan M., Kalkkinen N., Auvinen P., Kinnunen L., Stanway G. 1992. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 18: 8847–8851

Ito M., Yamashita T., Tsuzuki H., Takeda N., Sakae K. 2004. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *Journal of General Virology*, 85, 2: 391–398

Ito M., Yamashita T., Tsuzuki H., Kabashima Y., Hasegawa A., Nagaya S., Kawaguchi M., Kobayashi S., Fujiura A., Sakae K., Minagawa H. 2010. Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 8: 2683–2688

Joki-Korpela P, Hyypiä T. 1998. Diagnosis and epidemiology of echovirus 22 infections. *Clinical Infectious Diseases*, 27, 1: 129–136

Joki-Korpela P., Marjomaki V., Krogerus C., Heino J. Hyypiä T. 2001. Entry of human parechovirus 1. *Journal of Virology*, 75, 4 : 1958–1967

Kang X., Jiang T., Li Y., Lin F., Liu H., Chang G., Zhu Q., Qin E., Qin C., Yang Y. 2010. A duplex real-time RT-PCR assay for detecting H5N1 avian influenza virus and pandemic H1N1 influenza virus. *Virology Journal*, 7: 113

Kestenbaum L. A., Ebberson J., Zorc J. J., Hodinka R. L., Shah S. S. 2010. Defining cerebrospinal fluid white blood cell count reference values in neonates and young infants. *Pediatrics*, 125, 2: 257–264

Larsen L. E., Tjornehoj K., Viuff B., Jensen N. E., Utenthal A. 1999. Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish Cattle: reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11: 416

Legay V., Chomel J.J., Lina B. 2002. Specific RT-PCR procedure for the detection of human parechovirus type 1 genome in clinical samples. *Journal of Virological Methods*, 102: 157–160

Lewis-Rogers N., Crandall K.A. 2010. Evolution of Picornaviridae: an examination of phylogenetic relationships and cophylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 995–1005

Ljubin-Sternak S., Juretić E., Šantak M., Pleša M., Forčić D., Vilibić-Čavlek T., Aleraj B., Mlinarić-Galinović G. 2011. Clinical and molecular characterization of a parechovirus type 1 outbreak in neonates in Croatia. *Journal of Medical Virology*, 83, 1: 137–141

Mirand A., Archinbaud C., Chambon M., Regagnon C., Brebion A., Bailly JL., Peigue-Ladeiulle H., Henguell C. 2012. Diagnosis of human parechovirus infection of the central nervous system with a commercial real-time reverse transcription-polymerase chain reaction kit and direct genotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 74, 1: 78–80

Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaffer M. A. 2005. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier: 963 str.

Nateri A.S., Hughes P.J., Stanway G. 2000. In vivo and in vitro identification of structural and sequence elements of the human parechovirus 5' untranslated region required for internal initiation. *Journal of Virology*, 74, 14: 6269–6277

Nix W.A., Maher K., Johansson E.S., Niklasson B., Lindberg A.M., Pallansch M.A., Oberste M.S. 2008. Detection of all known parechoviruses by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 8: 2519–2524

Nix W.A., Maher K., Pallansch M.A., Oberste M.S. 2010. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *Journal of Clinical Virology*, 48, 3: 202–207

Noordhoek G.T., Weel J.F.L., Poelstra E., Hooghiemstra M., Brandenburg A.H. 2008. Clinical validation of the new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *Journal of Clinical Virology*, 41: 75–80

Pajkrt D., Benshop K.S.M., Westerhuis B., Molenkamp R., Spanjerberg L., Wolthers K.C. 2009. Clinical characteristics of human parechovirus 4-6 infectious in young children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28, 11: 1008–1010

Pineiro L., Vicente D., Montes, M., Hernandez-Dorronsoro U., Cilla, G. 2010. Human parechoviruses in infants with systemic infection. *Journal of Medical Virology*, 82, 10: 1790–1796

Platt A.R., Woodhall R.W., George A.L.Jr. 2007. Improved sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques*, 43: 58–62

Poljak M., Seme K. 2009. Virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja. *Medicinski razgledi*, 48, 5: 54–58

Rotbart H. A., Romero J. R. 1995. Laboratory diagnosis of enteroviral infections. V: *Human Enterovirus Infections*, Rotbart H. (ur.), Washington, DC, ASM Press: 401–418

Samuilova O., Krogerus C., Fabrichniy I., Hyypia, T. 2006. ATP hydrolysis and AMP kinase activities of nonstructural protein 2C of human parechovirus 1. *Journal of virology*, 80, 2: 1053–1058

Sedmak G., Nix W.A., Jentzen J., Haupt H.E., Davis J.P., Bhattacharyya S., Pallansch M.A., Oberste M. S. 2010. Infant deaths associated with human parechovirus infection in Wisconsin. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 3: 357–361

Stanway G., Kalkkinen N., Roivainen M., Ghazi F., Khan M., Smyth M., Meurman O., Hyypia, T. 1994. Molecular and biological characteristics of echovirus 22: a representative of a new picornavirus group. *Journal of virology*, 68, 12: 8232–8238

Stanway G., Hyypiä T. 1999. Parechoviruses. *Journal of Virology*, 73, 7: 5249–5254

Stanway G., Joki-Korpela P., Hyypiä T. 2000. Human parechoviruses-biology and clinical significance. *Reviews in medical virology*, 10, 1: 57–69

Steyer A., Poljak M., Petrovec M. 2011. Pikornavirusi. V: Medicinska virologija. Poljak M., Petrovec M. (ur.). Ljubljana, Društvo medicinski razgledi: 111-124

Tapia G., Cinek O., Witso E., Kulich M., Rasmussen T., Grinde B., Ronningen K.S. 2008. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *Journal of Medical Virology*, 80, 10: 1835–1842

Tapia G., Cinek O., Rasmussen T., Grinde B., Stene L.C. Ronningen K.S. 2011. Longitudinal study of parechovirus infection in infancy and risk od positivity for multiple islet autoantibodies: the MIDIA study. *Pediatric diabetes*, 12: 58–62.

Triantafilou K., Vakakis E., Orthopoulos G., Ahmed M.A., Schumann C., Lepper P.M., Triantafilou M. 2005. TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. *European Journal of Immunology*, 35, 8: 2416–2423

Van der Sanden S., de Bruin E., Vennema H., Swanink C., Koopmans M., Van der Avoort H. 2008. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 9: 2884–2889

Verboon-Maciolek M.A., Krediet T.G., Gerards L.J., De Vries L.S., Groenendaal F., van Loon A.M. 2008. Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection, 27: 241–245

Volpe J.J. 2008. Neonatal encephalitis and white matter injury – more than just inflammation? *Annals of Neurology*, 64, 3: 232–236

Wakatsuki K., Kawamoto D., Hiwaki H., Watanabe K., Yoshida H. 2008. Identification and characterization of two strains of human parechovirus 4 isolated from two clinical cases in Fukuoka city, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 9: 3144–3146

Watanabe K., Oie M., Higuchi M., Nishikawa M., Fujii M. 2007. Isolation and characterizations of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 6: 889–895

Wigand R., Sabin A. B. 1961. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 11: 224–247

Wildenbeest J.G., Harvala H., Pajkrt D., Wolthers K.C. 2010. The need for treatment against human parechoviruses: how, why and when? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8, 12: 1417–1429

Wolthers K., Benschop K.S.M., Schinkel J., Molenkamp R., Bergevoet R.M., Spijkerman I.J.B., Kraakman H.C., Pajkrt D. 2008. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 3: 358–363

Picornavirus study group

<http://www.picornastudygroup.com/types/index.html> (30. Avg. 2012).

Yamamoto M., Abe K., Kuniyori K., Kunii E., Ito F., Kasama Y., Yoshioka Y., Noda M.
2009. Epidemic of human parechovirus type 3 in Hiroshima city, Japan in 2008.
Japanese Journal of Infectious Diseases., 62: 244–245

Zoll J., Galama J.M.D., van Kuppeveld F.J.M. 2009. Identification of potential
recombination breakpoints in human parechoviruses. Journal of Virology, 83, 7:
3379–3383

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med., za prevzeto mentorstvo, s čimer mi je omogočil izvedbo diplomske naloge v svojem laboratoriju. Zahvalila bi se za potrpežljivost in ves dragoceni čas, ki mi ga je namenil.

Iskrena hvala Kristini Fujs Komloš, univ. dipl. mikr., za praktično usposabljanje v laboratoriju ter usmerjanje pri izvedbi in pisanju diplomske naloge. Najlepša ji hvala tudi za veliko koristnih nasvetov ter za to, da mi je namenila veliko svojega časa in mi s tem pomagala pridobiti znanje, ki mi bo pomagalo v prihodnosti. Hvala ji za vso pomoč in podporo.

Zahvaljujem se prof. dr. Blagajani Herzog Velikonja, univ. dipl. biol., za hitro recenzijo diplomskega dela ter preneseno znanje molekularne biologije.

Hvala tudi prof. dr. Kristini Sepčić, univ. dipl. biol., za vse spobudne besede v času študija.

Hvala vsem zaposlenim v laboratoriju za pomoč pri nastajanju diplomskega dela in za vzpodbudne besede. Zahvaljujem se vam za vsak odgovor na še tako banalno vprašanje, ki sem ga zastavila. Hvala vam tudi za tiste trenutke smeha, ki so delo naredili prijetnejše.

Iz srca se zahvaljujem staršem in sestrici Klari, ki so me spodbujali ves čas študija ter so mi v veliko oporo. Najlepša hvala tudi mojim starim staršem, ki so poslušali vse moje monologe, se smejali mojim anekdotam in mi dajali neverjetno podporo. Hvala tudi Dinu, ki je vsa leta poslušal moje pridige, me podpiral, se smejal z menoj moji nespretnosti. Beseda "HVALA" ni dovolj, da bi vam povedala, kako sem vam hvaležna za vso podporo, vzpodbudo in zaupanje.

Prav tako bi se rada zahvalila Sanji in Ireni, ki sta z menoj preživeli veliko lepih študentskih dni, za številne prijetne trenutke in spodbudo. Hvala tudi ostalim prijateljem za prelepe študentske dni.

Iskrena hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A:

Rezultati (Ct vrednosti) testiranja 10-kratnih razredčin celične kulture HPeV1, sev HR-11722-07 s testom "Parechovirus r-geneTM"

Legenda: / – ni rezultata; - – narejeno v enakem poskusu; Št. – številka zaporednega poskusa, cc – oznaka za razredčino celične kulture.

Št.	“Parechovirus r-gene TM ” (Ct vrednosti)					
	cc5	cc4	cc3	cc2	cc1	cc0
1.	37,05	/	/	/	/	/
2.	37,04	> 40,00	/	/	/	/
3.	37,27	/	/	/	/	/
4.	37,21	>40,00	> 40,00	/	/	/
5.	36,26	/	39,31	/	/	/
6.	37,44	39,44	/	/	/	/
7.	37,49	> 40,00	/	/	/	/
8.	37,88	> 40,00	/	/	/	/
9.	> 40,00	> 40,00	/	/	/	/
10.	34,72	/	/	/	/	/
11.	35,72	35,34	/	/	/	/
12.	33,45	/	39,83	/	/	/

Povprečje Ct vrednosti	36,79	39,25	39,71	0	0	0
Ponovljivost	100 %	50 %	25 %	0 %	0 %	0 %
Koncentracija cel. kulture (TCID₅₀/ml)	3,16	0,31	0,03	0,003	0,0003	0,00003

Priloga B:

Seznam 41 kliničnih vzorcev CSF, v katerih niso bili dokazani drugi virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja, testiranih z RT-PCR v realnem času in "Parechovirus r-gene™" ter klasično enostopenjsko RT-PCR

Legenda: HPeV – človeški parehovirus, NEG – negativno, POZ – pozitivno.

Št.	Spol	Starost ob odvzemu vzorca	"Parechovirus r-gene™" (Ct)	Klasična enostopenjska RT-PCR
1.	M	22 dni	POZ (40,77)	POZ
2.	M	17 dni	POZ (39,47)	POZ
3.	Ž	27 dni	POZ (38,25)	POZ
4.	M	14 dni	POZ (39,49)	POZ
5.	Ž	8 dni	POZ (39,12)	POZ
6.	M	28 mesecev	NEG	NEG
7.	M	1 mesec	NEG	NEG
8.	M	1 mesec	NEG	NEG
9.	M	20 mesecev	NEG	NEG
10.	Ž	28 mesecev	NEG	NEG
11.	Ž	3 mesece	NEG	NEG
12.	Ž	3 mesece	NEG	NEG
13.	Ž	14 dni	NEG	NEG
14.	Ž	39 mesecev	NEG	NEG
15.	Ž	11 mesecev	NEG	NEG
16.	Ž	60 mesecev	NEG	NEG
17.	M	12 dni	NEG	NEG
18.	M	15 dni	NEG	NEG
19.	Ž	35 mesecev	NEG	NEG
20.	Ž	19 mesecev	NEG	NEG
21.	Ž	29 dni	NEG	NEG
22.	M	19 dni	NEG	NEG
23.	Ž	51 mesecev	NEG	NEG
24.	M	42 mesecev	NEG	NEG
25.	Ž	7 mesecev	NEG	NEG
26.	M	10 mesecev	NEG	NEG
27.	M	4 mesece	NEG	NEG
28.	M	8 dni	NEG	NEG
29.	Ž	26 mesecev	NEG	NEG
30.	Ž	28 mesecev	NEG	NEG
31.	Ž	24 mesecev	NEG	NEG
32.	M	18 dni	NEG	NEG
33.	M	55 mesecev	NEG	NEG
34.	M	1 dan	NEG	NEG
35.	M	9 dni	NEG	NEG
36.	M	23 mesecev	NEG	NEG

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga B:

Seznam 41 kliničnih vzorcev CSF, v katerih niso bili dokazani drugi virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja, testiranih z RT-PCR v realnem času in "Parechovirus r-gene™" ter klasično enostopenjsko RT-PCR.

Legenda: HPeV – človeški parehovirus, NEG – negativno, POZ – pozitivno.

Št.	Spol	Starost ob odvzemuh vzorca	"Parechovirus r-gene™" (Ct)	Klasična enostopenjska RT-PCR
37.	M	18 mesecev	NEG	NEG
38.	Ž	1 mesec	NEG	NEG
39.	Ž	4 mesece	NEG	NEG
40.	Ž	14 dni	POZ (> 40,00)	POZ
41.	M	60 mesecev	NEG	NEG