

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara HRAST

**DOKAZOVANJE VIRUSA INFLUENCE TIPA A Z METODO  
VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO V REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DETECTION OF INFLUENZA VIRUS TYPE A WITH REAL-TIME  
POLYMERASE CHAIN REACTION**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miroslava Petrovca in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič Županc.

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Barbara Hrast 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.

Barbara Hrast

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7 : 578.8 : 577.2.08 (043) =163.6
- KG virusi/virus influence tipa A/ gripa/antigenski odmik/antigenski premik/diagnostične metode/izolacija nukleinske kisline/RT-PCR v realnem času
- AV HRAST, Barbara
- SA PETROVEC, Miroslav (mentor)/AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2009
- IN DOKAZOVANJE VIRUSA INFLUENCE TIP A Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO V REALNEM ČASU
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 56 str., 4 pregl., 16 sl., 1 pril., 69 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Virus influence A je najpogostejši povzročitelj gripe pri ljudeh. Virus je antigensko zelo spremenljiv, kar vodi v sezonske epidemije in občasne pandemije. Pri večini okuženih je potek bolezni kratkotrajen, brez večjih zapletov. Pri starejših osebah, majhnih otrocih in kroničnih bolnikih lahko bolezen poteka v težji obliki, z zapleti. Hitra in natančna diagnostika gripe je ključna za učinkovito zdravljenje bolezni. RT-PCR v realnem času je v literaturi opisana, kot trenutno najbolj specifična in občutljiva metoda za dokazovanje influence. Namen naloge je bil primerjava občutljivosti RT-PCR, z občutljivostjo direktne imunofluorescence (DIF), ki se jo uporablja v redni diagnostiki virusa influence A. V raziskavo smo vključili 238 vzorcev, ki so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij v Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, januarja in februarja 2008. S pomočjo avtomatizirane metode smo iz vseh vzorcev izolirali skupno nukleinsko kislino. Virusno RNA, in sicer ohranjen del matričnega gena, smo pomnoževali v aparaturi StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). Pri tem smo uporabljali reagente SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Dokazovanje pridelkov je potekalo hkrati s pomnoževanjem tarčnega odseka. Virus influence A smo dokazali v 7,6 % od 238 vzorcev. V redni diagnostiki so antigene virusa gripe dokazali le v 1,3 % od 236 vzorcev. Od 238 vzorcev, jih 2,8 % z DIF ni bilo pregledanih. V nobenem od teh vzorcev, virusne nukleinske kisline nismo dokazali. Delež pozitivnih vzorcev, ki smo jih dokazali le z RT-PCR, v primerjavi s pozitivnimi vzorci, ki smo jih dokazali z obema diagnostičnima metodama, je bil 83,3 %. Prevalenca okužbe je bila višja pri preiskovancih starih več kot pet let, v primerjavi s preiskovanci, ki so bili stari pet let ali manj. Aktivnost virusa influence je bila višja januarja, kot februarja 2008. Na podlagi izsledkov naše raziskave lahko zaključimo, da je metoda RT-PCR bolj občutljiva od metode DIF ter da ima pred njo številne prednosti. RT-PCR predstavlja zanesljivo metodo, ki je primerna za rutinsko diagnostiko virusov influence tipa A.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 578.7 : 578.8 : 577.2.08 (043) =163.6
- CX viruses/influenza virus type A/influenza/antigenic drift/antigenic shift/diagnostic methods/extraction of nucleic acid/real-time RT-PCR
- AU HRAST, Barbara
- AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2009
- TI DETECTION OF INFLUENZA VIRUS TYPE A WITH REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 56 p., 4 tab., 16 fig., 1 app., 69 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Influenza A virus is the most frequent cause of influenza in humans. Virus is genetically variable and causes seasonal epidemics and occasional pandemics. The majority of infected persons exhibit self-limited, uncomplicated, febrile respiratory symptoms. Elderly persons, very young persons and persons with underlying medical conditions may exhibit severe symptoms with complications due to infection. Rapid and accurate laboratory diagnosis of influenza is critical for its treatment. In the literature RT-PCR is described as currently the most specific and sensitive method for detection of influenza viruses. The aim of the study was to compare sensitivity of real-time RT-PCR and sensitivity of direct fluorescent antibody staining for influenza A antigen detection (FA), which is used as routine diagnostic test. In the research we included 238 respiratory specimens. Specimens were sent to Laboratory for diagnosis of viral infection at the Institute of Microbiology and Immunology, in January and February 2008. The total nucleic acid from all specimens was extracted with automated nucleic acid extraction. The conserved fragment of virus influenza A matrix gene was amplified with RT-PCR. Amplification was performed in StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), by using commercial kits SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Influenza A virus was detected in 7,6 % of all 238 analysed specimens by RT-PCR and in 1,3 % of 236 specimens by FA. 2,8 % of 238 could not be analysed by FA, but none of these was positive by RT-PCR. The proportion of specimens positive only by RT-PCR among specimens positive by both diagnostic methods was 83,3 %. The prevalence of infection was higher in patients older than 5 years old than for patient 5 years old or younger. The activity of the influenza A virus was higher in January than February 2008. In conclusion, our research indicate that real-time RT-PCR is more sensitive method for detection of influenza A virus and has many advantages over FA. RT-PCR represents a reliable method that can be implemented in routine diagnosis of influenza A viruses.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>4</b>
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED .....	4
2.2 ZNAČILNOSTI VIRUSOV INFLUENCE.....	5
2.2.1 Taksonomska uvrstitev .....	5
2.2.2 Poimenovanje.....	6
2.2.3 Zgradba .....	6
2.2.4 Genom.....	8
2.2.5 Življenjski cikel virusa .....	8
2.3 EPIDEMIOLOŠKE ZNAČILNOSTI .....	10
2.3.1 Antigenski odmik.....	11
2.3.2 Antigenski premik .....	11
2.3.3 Naravni rezervoarji virusov influence.....	12
2.3.3.1 Ptičja gripa.....	13
2.3.4 Epidemiološko spremljanje gripe .....	15
2.3.4.1 V svetu.....	15
2.3.4.2 V Sloveniji v sezoni 2007/2008 .....	15
2.4 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA GRIPE .....	17
2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE GRIPE .....	18
2.6 DIAGNOSTIKA GRIPE.....	18
2.6.1 Klinična diagnostika.....	18
2.6.2 Laboratorijska diagnostika .....	19
2.6.2.1 Osamitev virusa .....	20
2.6.2.2 Posredne metode.....	21
2.6.2.3 Neposredne metode .....	21
2.6.2.4 Molekularne metode .....	22
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>23</b>
3.1 VZORCI.....	23
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE .....	23
3.3 METODE DELA .....	24
3.3.1 Direktna imunofluorescenca.....	24

<b>3.3.2</b>	<b>Izolacija celokupne nukleinske kisline.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Pomnoževanje virusne nukleinske kisline.....</b>	<b>27</b>
3.3.3.1	Začetni oligonukleotidi.....	27
3.3.3.2	Sonda.....	28
3.3.3.3	Kontrole.....	28
3.3.3.4	Verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR) v realnem času.....	28
3.3.3.4.1	Teoretične osnove.....	28
3.3.3.5	Enostopenjski RT-PCR v realnem času za virus influence A.....	33
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>35</b>
4.1	VZORCI.....	35
4.2	REZULTATI METODE RT-PCR V REALNEM ČASU.....	36
4.3	PRIMERJAVA REZULTATOV METODE RT-PCR V REALNEM ČASU Z REZULTATI METODE DIF.....	38
4.3.1	Vrednosti Ct.....	39
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>41</b>
5.1	RAZPRAVA.....	41
5.2	SKLEPI.....	47
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>49</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b>	Klinični vzorci iz kužnin dihal, ki so bili vključeni v raziskavo .....	35
<b>Preglednica 2:</b>	Število pregledanih kliničnih vzorcev v mesecu januarju in februarju leta 2008 .....	36
<b>Preglednica 3:</b>	Rezultati testiranja vzorcev na okužbo z virusom INF A, z metodo DIF in RT-PCR .....	38
<b>Preglednica 4:</b>	Pozitivni rezultati testiranja vzorcev z metodo RT-PCR v realnem času in vrednosti Ct .....	39

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba virusov influence tipa A: shematski prikaz zgradbe (A), elektronsko mikroskopski posnetek (B) (Gurtler, 2006: 88) .....	7
<b>Slika 2:</b> Življenjski cikel virusa influence A (Todar, 2007: 1).....	9
<b>Slika 3:</b> Antigenski premik .....	12
<b>Slika 4:</b> Gostitelji virusov influence A (Webster in sod., 1992: 156) .....	13
<b>Slika 5:</b> Pojavljanje virusov influence tipa A in B po tednih, v obdobju med oktobrom 2007 in majem 2008 (Kraigher in sod., 2008: 27) .....	16
<b>Slika 6:</b> Shematski prikaz metode direktne imunofluorescence za dokazovanje virusnih antigenov v okuženih celicah.....	24
<b>Slika 7:</b> Princip izolacije nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Kirchgesser in sod., 2003: 12) .....	26
<b>Slika 8:</b> Shematski prikaz genskega odseka 7 z mesti pripenjanja začetnih oligonukleotidov in sonde.....	27
<b>Slika 9:</b> Shematski prikaz reakcije RT-PCR v realnem času (Bustin in Mueller, 2005: 367) ....	30
<b>Slika 10:</b> Sonda MGB (Kutyavin in sod., 2000: 658).....	32
<b>Slika 11:</b> Krivulja pomnoževanja tarčnega nukleotidnega zaporedja z metodo PCR v realnem času (What is ..., 2009).....	33
<b>Slika 12:</b> Število preiskovancev v posamezni starostni skupini, katerih vzorce smo prejeli v Laboratorij za virusne infekcije, v januarju in februarju leta 2008 in jih testirali na prisornost virusa INF A.....	35
<b>Slika 13:</b> Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa INF A v januarju in februarju leta 2008, dokazanih z metodo RT-PCR realnem času in metodo DIF.....	36
<b>Slika 14:</b> Število pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa INF A v posameznem tednu januarja in februarja leta 2008 .....	37
<b>Slika 15:</b> Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa INF A v posamezni starostni skupini, dokazanih z metodo RT-PCR v realnem času in metodo DIF .....	37
<b>Slika 16:</b> Okvir z ročaji za vrednosti Ct glede na rezultate metode DIF .....	40



## KAZALO PRILOG

<b>Priloga A1:</b> Seznam 238 vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času in rezultati rutinskega testiranja z DIF .....	58
--	----

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AT	aspirat traheje
BAL	bronhoalveolarni izpirek
B. NF	bris nosnožrelne sluznice
bp	bazni par
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. complementary deoxyribonucleic acid)
CPU	citopatski učinek
Ct	fluorescenčni prag (angl. threshold cycle)
ddH <sub>2</sub> O	deionizirana destilirana voda
DIF	metoda direktne imunofluorescence
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
EISS	angl. European Influenza Surveillance Scheme
FAM	karboksi fluorescein
FRET	prenos fluorescenčne resonančne energije (angl. fluorescence resonance energy transfer)
HA	hemaglutinin
IDSA	angl. Infectious Disease Society of America
INF A	virus influence tipa A
IVZ	Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije
M1, M2	matrična beljakovina
MGB	angl. minor groove binding oligoprobe
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina
NA	nevraminidaza
NP	nukleokapsidna beljakovina
NS1, NS2	nestrukturna beljakovina
NT	vzorec, ki ni bil testiran
PA	kisla beljakovina
PB1, PB2	bazični beljakovini
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)

RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RNP	ribonukleoproteinski kompleks
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
TAMRA	karboksi tetrametil rodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

## 1 UVOD

Okužbe dihal so najbolj pogoste bolezni pri ljudeh in pogost vzrok smrti pri majhnih otrocih ter starostnikih (Weissbrich in sod., 2006; Kahn, 2006). Čeprav so okužbe dihal po kliničnih znakih lahko prepoznavne, je etiologija povzročiteljev pogosto neznana. Okužbe povzroča širok spekter mikroorganizmov, med katerimi prevladujejo virusi. Med respiratorne viruse prištevamo viruse influence tipa A, B in C, viruse parainfluence 1, 2, 3 in 4, adenoviruse, respiratorni sincicijski virus, humani metapnevmovirus, humani rinovirus, koronavirus in humani bokavirus (Gillim-Ross in Subbarao, 2006).

Gripa ali influenza je zelo nalezljiva okužba dihal. Povzročajo jo virusi influence, ki jih uvrščamo v tri rodove znotraj družine *Orthomyxoviridae*. Najpogostejši povzročitelj gripe je virus influence A (INF A). Virus je povzročitelj vsakoletnih sezonskih epidemij in občasnih hudih pandemij (Potter, 2004). Visoka infektivnost virusa je posledica pogostih sprememb v virusnem genomu, ki vodijo v veliko raznolikost površinskih glikoproteinov in obstoja številnih sevov virusa. Spremembe v glikoproteinih virusu omogočajo, da se uspešno izmuzne imunskemu odzivu gostitelja, ki lahko za gripo večkrat zboli (Daum in sod., 2007).

Za gripo vsako leto zboli ogromno število ljudi po vsem svetu, v Sloveniji približno 60.000 (Dolenc, 2005). Posledica velike obolevnosti ljudi, predvsem v zimskem času in odsotnosti ljudi z dela, je manjša produktivnost in s tem ekonomske izgube (Gavin in Thomson, 2003). Večina okužb z virusi influence je samoomejujočih, v nekaterih primerih pa lahko potekajo v težji obliki, z zapleti in jih je potrebno zdraviti v bolnišnici (Harper in sod., 2009).

Natančna laboratorijska diagnostika okužb z virusom influence A omogoča ustrezno protivirusno zdravljenje, zmanjša stroške bolnišničnega zdravljenja, omogoča epidemiološki nadzor in spremljanje pojavljanja novih virusnih sevov in podtipov (Kuypers in sod., 2006). Ustrezna in hitra laboratorijska potrditve okužbe je še toliko pomembnejša v primerih, ko sodi obolela oseba v skupino ljudi z večjim tveganjem za razvoj zapletov. Diagnostika okužb z virusi gripe temelji na osamitvi virusa iz kužnine,

neposrednem dokazovanju virusnih antigenov ter dokazovanju virusne nukleinske kisline (Petric in sod., 2006). Metodo direktne imunofluorescence (DIF) najpogosteje uporabljamo v dnevnem testiranju vzorcev dihal, v katerih lahko hkrati dokazujemo viruse influence A in B, viruse parainfluence 1, 2 in 3, adenoviruse ter respiratorni sincicijski virus. Metoda je hitra in razmeroma enostavna, vendar ima tudi nekaj pomanjkljivosti (Leland, 1996).

Številne študije so pokazale, da je verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR, angl. reverse transcription polymerase chain reaction), s katero dokazujemo virusno ribonukleinsko kislino (RNA, angl. ribonucleic acid), trenutno najbolj občutljiva in specifična diagnostična metoda za dokazovanje okužb z virusi influence. Metoda je razmeroma hitra, poda nam objektivne rezultate ter omogoča razlikovanje med podtipi in sevi virusa (Kuypers in sod., 2006, Harper in sod., 2009).

## 1.1 NAMEN DELA

Za virus influence A je značilna velika genetska raznolikost, ki je deloma posledica delovanja polimeraze RNA. Encim omogoča podvojevanje virusnega genoma, vendar pri tem ustvarja številne napake. Frekvenca napak je 1 na  $10^4$  podvojenih baz (Webster in sod., 1992). Prav zaradi velike genske raznolikosti med sevi virusa influence A, predstavlja vpeljavo diagnostične metode, ki temelji na dokazovanju specifičnega virusnega nukleotidnega zaporedja, pravi izziv (Bustin in Mueller, 2005).

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti prednosti, ki jih prinaša metoda RT-PCR v realnem času v diagnostiko virusa influence A. Rezultate smo primerjali z rezultati metode DIF, ki jo v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij v Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, uporabljajo pri vsakodnevnem testiranju vzorcev na povzročitelje okužb dihal. Pri tem smo testirali vzorce, ki so bili kužnine dihal iz sezone gripe v letu 2007 in 2008. Med seboj smo primerjali dve starostni skupini in ugotavljali v kateri je pojavnost gripe največja.

Predvidevali smo, da je metoda RT-PCR bolj občutljiva od metode DIF in da bomo z njo dokazali okužbo z virusom influence tipa A v večjem številu vzorcev. Pričakovali smo, da bomo potrdili vse pozitivne vzorce, ki so jih dokazali v rutinski diagnostiki. Domnevali

smo tudi, da bomo v vzorcih, v katerih bomo dokazali okužbo le z RT-PCR, določili manjšo količino virusne RNA. S tem bi potrdili slabšo občutljivost metode DIF, na katero vpliva število okuženih epitelijskih celic v vzorcu. Pričakovali smo, da bo pojavnost okužbe večja pri majhnih otrocih.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Gripa je akutna nalezljiva bolezen dihal, ki jo povzročajo virusi influence A, B in C. Virusi gripe, predvsem tipa A in B, so podvrženi stalnim genetskim spremembam. Ta konstanten evolucijski razvoj virusov vodi v neprestano pojavljanje novih virusnih antigenških različic, ki povzročijo sezonske epidemije in občasne pandemije (Webster in sod., 1992).

Prvi zapisi o tej bolezni so nastali že v antičnem obdobju. O epidemiji gripe je prvi pisal Hipokrat, okoli leta 412 pr. n. št. Iz srednjega veka so se ohranili številni zapisi, ki pričajo o pojavljanju te bolezni. V njih je bila gripa poimenovana kot "pestilencia catarral". Zapisi o prvi pandemiji segajo v leto 1580. V 17. stoletju so za bolezen prvič uporabili izraz influenza (Garcia-Garcia in Ramos, 2006). Etiologija bolezni dolgo časa ni bila znana. Najprej so domnevali, da je povzročitelj gripe bakterija. Poimenovali so jo *Bacillus influenzae*. Pravega povzročitelja so odkrili šele leta 1933. Virus influence A je prvi prepoznal angleški znanstvenik Wilson Smith. S sodelavci je z nosnožrelnimi izločki bolnika okužil belega dihurja, iz katerega mu je nato uspelo virus tudi osamiti. Odkritje povzročitelja je omogočilo boljše razumevanje pandemičnega potenciala virusa ter privedlo do razvoja prvega cepiva leta 1936 (Kuszewski in Brydak, 2000).

Zgodovinarji menijo, da naj bi se v zadnjih 400 letih pripetilo 12 pandemij (Kuszewski in Brydak, 2000). V 20. stoletju je prišlo do treh večjih pandemij. Leta 1918 se je pojavil zelo virulenten podtip virusa influence A H1N1. Povzročil je strahovito pandemijo, ki je znana kot španska gripa in je terjala približno 20 do 40 milijonov življenj (Garcia-Garcia in Ramos, 2006). Španska gripa je prizadela najaktivnejšo populacijo med 20. in 40. letom starosti, ki je običajno najodpornejša proti navadni gripi (Dolenc, 2005). Na hud potek pandemije so vplivali tudi slabi socialnoekonomski pogoji med vojno in pomanjkanje osnovne zdravstvene oskrbe. Do naslednja pandemije, ki jo je povzročil podtip H2N2, je prišlo leta 1957. Azijska gripa je terjala več kot milijon žrtev. Nov pandemični podtip virusa influence A se je pojavil v letu 1968. Povzročitelj je bil podtip virusa influence A H3N2. Vir pandemije je bila Jugovzhodna Azija, poimenovali so jo hongkonška gripa. Leta 1977 se je podtip virusa influence A H1N1 nepričakovano ponovno pojavil. Virus

H1N1 je prizadel manjši del svetovne populacije, predvsem mlajše od 25 let, ki predhodno še niso prišli v stik z virusom (Kilbourne, 2006).

Po letu 1977 pa vse do danes se podtip H1N1 občasno razširja skupaj s podtipom H3N2 (Potter, 2004). Slednji povzroča hujšo obliko bolezni in je bolj podvržen genetskim spremembam, zato pogosteje povzroča epidemije (Monto, 2008). V zadnjih letih so bile v Sloveniji večje epidemije v sezonah 1989/90, 1993/94 in 1997/98 (Vse o ... , 2007).

Veliko zaskrbljenosti pred novo pandemijo je leta 1997 povzročil prvi primer okužbe človeka z visoko patogenim virusom ptičje gripe H5N1. Virus še vedno povzroča sporadične okužbe pri ljudeh, a zaenkrat ne izkazuje sposobnosti uspešnega širjenja med ljudmi (Garcia-Garcia in Ramos, 2006).

Pandemije se pojavljajo nepričakovano. Glede na potek in pojavljanje dosedanjih pandemij, med katerimi je bil interval od 10 do 40 let, znanstveniki domnevajo, da se bo naslednja pandemija gripe pojavila pred letom 2017 (Potter, 2004). V letu 2009 smo tik pred uresničitvijo teh napovedi. V začetku marca 2009 se je iz Mehike začela širiti t. i. nova gripa, ki jo povzroča nov podtip virusa influence A H1N1 (Gallaher, 2009).

## 2.2 ZNAČILNOSTI VIRUSOV INFLUENCE

### 2.2.1 Taksonomska uvrstitev

Viruse gripe razvrščamo v tri rodove: virusi influence A, B in C. Rodovi sodijo v družino *Orthomyxoviridae*. Za predstavnike družine je značilen segmentiran, negativno polaren, enovijačni RNA genom (Cox in Subbarao, 1999). Rodove ločimo med seboj na osnovi razlik v nukleokapsidnih (NP) in matričnih (M) beljakovinah. Na podlagi razlik v površinskih glikoproteinih, ki so pomembni virusni antigeni in se stalno nepredvidljivo spreminjajo, delimo viruse gripe tipa A še naprej v podtipe (Potter, 2004). Znanih je 16 podtipov hemaglutinina (HA) in 9 podtipov nevraminidaze (NA). Pri ljudeh se pojavljajo oblike hemaglutinina H1, H2 in H3 ter nevraminidazi N1 in N2 (Bouvier in Palese, 2008).



Virusi influence A povzročajo okužbe pri ljudeh in pri različnih živalskih vrstah, medtem ko so virusi influence tipa B in C značilni virusi človeka. Epidemiološki pomen za človeka imata predvsem virusa gripe tipa A in B (Potter, 2004) Virus influence C povzroča blage okužbe dihal. Okužbe s tem virusom so redke in se pojavljajo večinoma pri otrocih (Cox in Subbarao, 1999).

### 2.2.2 Poimenovanje

Poimenovanje virusov influence je standardno in vključuje:

- tip virusa
- ime gostitelja iz katerega je bil virus osamljen (le, če gre za žival)
- kraj prve izolacije
- laboratorijska številka prve izolacije
- leto prve izolacije
- za viruse tipa A, tudi podtip HA ter NA

Primer poimenovanja virusnega seva: A/Panama/2007/1999 (H3N2) (Palese in Shaw, 2007).

### 2.2.3 Zgradba

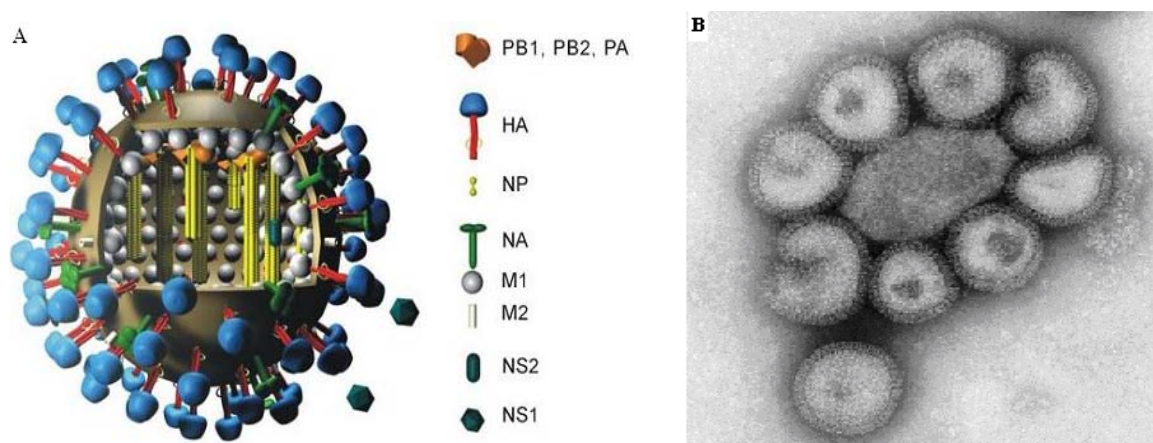
Povzročitelji gripe so vijačni pleomorfni virusi, ki v premeru merijo 80 do 120 nm (Palese in Shaw, 2007) (slika 1). Vsak delec je sestavljen iz približno 1 % RNA, 70-75 % beljakovin, 20-40 % maščob in 5-8 % ogljikovih hidratov (Potter, 2004).

Za virus gripe je značilna lipidna ovojnica. Iz površine ovojnice štrlijo številne peplomere, ki so sestavljene iz glikoproteinov, in sicer hemaglutinina in nevraminidaze. Hemaglutinin je trimer in je glavni antigen virusa. Pomemben je za pritrditev virusa na sialično kislino receptorjev, ki se nahajajo na površini epiteljskih celic dihalnih poti. Glikoprotein nevraminidaza je sestavljen iz štirih enakih podenot. Na površni virusa je zastopan v manjšem številu kot je molekul hemaglutinin. Ima encimsko aktivnost. Nevraminidaza cepi sialično kislino površinskih celičnih glikoproteinov ter s tem omogoča sprostitve nastalih virionov iz okužene celice (Murray in sod., 2005; Bouvier in Palese, 2008). Ostanke sialične kisline odstrani tudi s površine sproščenih virusov in tako prepreči

združevanje le-teh. Nekateri znanstveniki domnevajo, da je nevraminidaza odgovorna za razgradnjo sluzi v dihalnih poteh, kar olajšala prodor virusov influence do tarčnih epitelijskih celic (Matrosovich in sod., 2004).

V virusno ovojnico so vključeni membranski ionski kanali, ki so sestavljeni iz beljakovine M2. Ti sodelujejo pri slačenju virusa ter prehodu ribonukleoproteinov v citoplazmo okužene celice. Virusna ovojnica skupaj s površinskimi glikoproteini in beljakovino M2 pokriva matriks, ki je sestavljen iz beljakovine M1. Matriks prispeva k stabilnosti virusa (Zebedee in Lamb, 1988).

V notranjosti matriksa se nahaja ribonukleoproteinski kompleks (RNP). Sestavljen je iz osmih ločenih odsekov negativno polarne enovijačne RNA, ki so pokriti z NP ter od RNA odvisne polimeraze RNA. Slednja je sestavljena iz treh beljakovin, dveh bazičnih (PB1, PB2) ter kisle beljakovine (PA) (Bouvier in Palese, 2008). Polimeraza RNA ima endonukleazno aktivnost in je odgovorna za podvojevanje ter prepisovanje (Gurtler, 2006). V virusni sredici najdemo tudi nestrukturne beljakovine. Beljakovina NS1 sodeluje pri uravnavanju izražanja gostiteljskih genov, medtem ko naj bi beljakovina NS2 sodelovala pri prehodu virusne RNA iz jedra celice (Palese in Shaw, 2007).



**Slika 1:** Zgradba virusov influence tipa A: shematski prikaz zgradbe (A), elektronsko mikroskopski posnetek (B) (Gurtler, 2006: 88).

## 2.2.4 Genom

Genom virusa influence A je sestavljen iz 8 negativno polarnih enovijačnih molekul RNA. Vsak odsek vsebuje zapis za funkcionalno beljakovino. Odseki so oštevilčeni glede na dolžino:

- odsek 1: bazična beljakovina PB2
- odsek 2: bazična beljakovina PB1
- odsek 3: kislina beljakovina PA
- odsek 4: hemaglutinin HA
- odsek 5: nukleokapsidna beljakovina NP
- odsek 6: nevraminidaza NA
- odsek 7: matrična beljakovina M1 ter beljakovina ionskih kanalčkov M2
- odsek 8: nestrukturni beljakovini NS1 in NS2

Pri nekaterih podtipih virusa gripe tipa A lahko odsek 2 vsebuje zapis za dodatno beljakovino PB2-F2. Beljakovini M2 ter NS2 nastaneta po izražanju genskih odsekov 7 oziroma 8, z dodatnim izrezovanjem RNA. Vsak odsek genomske RNA je obdan z beljakovino NP ter zaključen z lasnici podobno vijačno strukturo. Ta struktura je povezana s kompleksom polimeraze RNA. Konci segmentov so močno ohranjeni in delujejo kot promotorji za pomnoževanje in prepisovanje virusne nukleinske kisline (Gurtler, 2006; Bouvier in Palese, 2008).

## 2.2.5 Življenjski cikel virusa

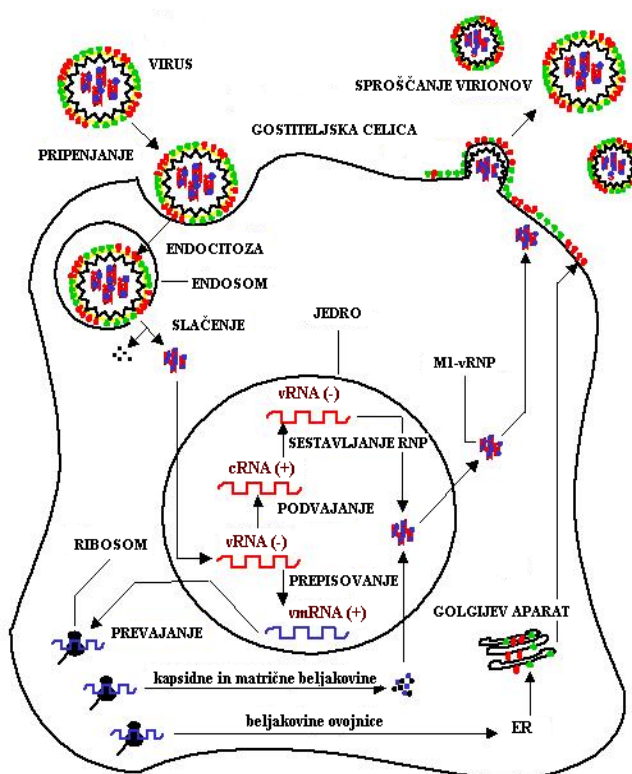
Virus influence se s površinskimi hemaglutinini veže na ostanke sialične (N-acetilnevraminske) kisline celic epitela zgornjih dihalnih poti. Mesta pripenjanja molekul HA so vezi, ki jih sialična kislina tvori z galaktozo v celičnih glikokonjugatih. Vezi  $\alpha$ -2,3 oziroma  $\alpha$ -2,6 določajo specifičnost gostitelja za viruse influence (Couceiro in sod., 1993).

Virus vstopi v celico s procesom endocitoze. Znižanje pH v endosomu povzroči konformacijsko spremembo molekule HA, ki izpostavi peptid zlitja. Ta omogoča zlitje virusne ovojnice z membrano endosoma. To povzroči nastanek pore, preko katere se RNP sprostijo v celično citoplazmo (Murray in sod., 2005; Bouvier in Palese, 2008).

V nasprotju z drugimi RNA virusi, se podvajanje virusa influence odvija v jedru okuženih celic (Palese in Shaw, 2007). Virusna polimeraza RNA omogoča sintezo virusnih mRNA ter sintezo komplementarnih pozitivno polarnih odsekov RNA. Ti so nato prepisani v genomske negativno polarne odseke RNA (Bouvier in Palese, 2008).

Virusne mRNA potujejo iz jedra v citoplazmo, kjer so na ribosomih endoplazemskega retikuluma prevedene v virusne beljakovine. Glikozilacija beljakovin poteka v Golgijevem aparatu. Nastali glikoproteini in beljakovine M2 potujejo do celične lipidne membrane v katero se vključijo. Del nastalih proteinov potuje v jedro, kjer se združijo z novo nastalimi genomskimi odseki enovijačne RNA, v komplekse RNP (Bouvier in Palese, 2008).

Kadar je na površini celične membrane dosežena ustrezna količina virusnih glikoproteinov, se matrična beljakovina M1 in kompleks RNP približata celični membrani ter se z glikoproteini združita v virusni delec (Gurtler, 2006). Oblikuje se brstič, ki se odščipne in kot zrel virus sprosti v celično okolje. Življenjski cikel virusa influence traja od 6 do 8 ur (Murray in sod., 2005).



Slika 2: Življenjski cikel virusa influence A (Todar, 2007: 1).

### 2.3 EPIDEMIOLOŠKE ZNAČILNOSTI

Gripa je bolezen, ki prizadene ljudi vseh starostnih skupin (Gavin in Thomson, 2003). Virusi influence se običajno prenašajo s kužnimi kapljicami ali aerosoli. Bolniki jih v okolico širijo s kašljem in kihanjem. Prenos je možen tudi s posrednim ali neposrednim stikom z izločki dihal. Bolniki so kužni 2 dni pred in 5 dni po pojavu bolezenskih znakov (Kamps in Reyes-Terán, 2006). Otroci lahko širijo virus v okolico več kot 10 dni, imunsko oslabei bolniki pa tudi več tednov ali celo mesecev po okužbi (Hoffmann in Kamps, 2006; Harper in sod., 2009).

Za okužbo so najbolj občutljivi starejši ljudje, bolniki s kroničnimi srčnimi, pljučnimi, presnovnimi ter drugimi boleznimi, kadilci, imunsko oslabei, nosečnice in otroci, ki so mlajši od dveh let. Pri teh skupinah je značilen težji potek bolezni, s pogostimi zapleti (Monto, 2008). Gripa povzroča največjo umrljivost pri ljudeh starejših od 65 let. Obolevnost zaradi gripe je največja pri otrocih, ki so ključen prenašalec okužbe na druge ljudi (Simonsen, 1999).

Za gripo je značilno, da ne pušča dosmrtno imunosti. Za boleznijo lahko večkrat zbolimo (Murray in sod., 2005). Ta lastnost influence je povezana z izrazito genetsko raznolikostjo virusa, ki je posledica njegovega segmentiranega genoma in aktivnosti polimeraze RNA, ki pri podvojevanju in prepisovanju dela napake. K raznolikosti prispeva tudi sposobnost virusa, da lahko okuži tako človeka kot tudi različne živalske vrste (Webster in sod., 1992).

Virusni površinski hemaglutinini ter nevraminidaze so najbolj podvrženi spreminjanju, spreminjajo pa se tudi druge virusne beljakovine. Vzrok za to so točkaste mutacije v posameznih odsekih genoma in genetske rekombinacije oziroma prerazporeditve odsekov. Posledica teh dogajanj je nastanek novih podtipov in sevov virusa gripe A, s spremenjenimi antigenskimi lastnostmi (Koren in Avšič-Županc, 2005). Na neprestano spreminjanje virusa vpliva tudi imunska selekcija (Palese in Shaw, 2007).

### 2.3.1 Antigenski odmik

Manjšo antigensko spremembo, ki nastane zaradi mutacije v genih HA in NA, imenujemo antigenski odmik (angl. drift) (Koren in Avšič-Županc, 2005). Ta sprememba povzroči nastanek novega seva virusa gripe. Virusu omogoča, da se izogne imunosti, ki je prisotna v določeni populaciji (Palese in Shaw, 2007). Novi nekoliko spremenjeni virusi niso popolnoma nevtralizirani s strani protiteles, ki jih je osebek razvil ob predhodni okužbi z virusom gripe. Običajno je le manjši del populacije, v kateri virus kroži, delno zaščiten pred njim. To omogoča virusu hiter prenos med osebki, kar povzroči epidemijo (Potter, 2004). Epidemije najpogosteje povzroča virus influence A, in sicer na vsakih 2 do 3 leta. Virus gripe B povzroča epidemije na vsakih 6 let, medtem ko virus influence C epidemij ne povzroča in se večina ljudi z njim prekuži že do 15 leta starosti (Marolt-Gomišček, 2002). Epidemije gripe se v krajih z zmerno klimo pojavljajo v zimskem obdobju. Na severni zemeljski polobli v mesecih med novembrom in aprilom, na južni polobli med majem in septembrom (Simonsen, 1999). Obdobje v katerem virusi influence krožijo v določeni populaciji imenujemo sezona gripe (Harper in sod., 2009).

Za epidemijo gripe je značilno, da se nenadoma in zelo hitro začne. Obolevnost med ljudmi v določeni populaciji je zelo velika. Vrh doseže v drugem ali tretjem tednu in običajno ne traja dlje od petih do šestih tednov (Gavin in Thomson, 2003). V času epidemije zbolijo od 10 do 20 % ljudi, v posameznih starostnih skupinah lahko tudi do 50 % (Marolt-Gomišček, 2002). Med epidemijo je značilno večje število umrlih, predvsem pri starejših od 65 let in zelo mladih. Poraste tudi število ljudi, ki se zdravijo v bolnišnici zaradi obolenj dihal (Simonsen, 1999).

### 2.3.2 Antigenski premik

Večjo antigensko spremembo, ki nastane kot posledica genetske rekombinacije med genomi različnih virusnih sevov gripe, vključno s sevi živalskega izvora, imenujemo antigenski premik (angl. shift) (Murray in sod., 2005). Domnevajo, da pride do genetske rekombinacije med sočasno okužbo celice z dvema različnima, običajno sorodnima sevoma virusa influence. To omogoča naključno prerazporejanje celotnih genomskih odsekov v nove virione (slika 3). Te genetske spremembe so značilne le za virus influence

A in vodijo v nastanek novega podtipa. Pojavu novega podtipa običajno sledi izginotje starega podtipa virusa influence, ki je do tedaj krožil v populaciji (Potter, 2004). Antigeni premik lahko povzroči nastanek pandemije (Murray in sod., 2005).

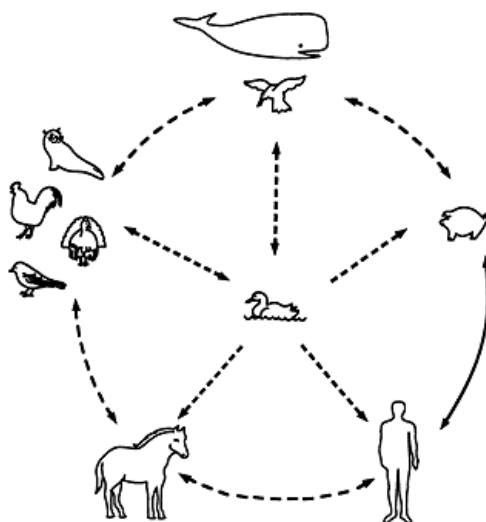
Za pandemijo je značilno, da se nov podtip virusa influence med ljudmi enostavno in hitro širi, saj celotna človeška populacija nima protiteles proti novemu virusu. Na ta način povzroči eksplozivne izbruhe bolezni na več kontinentih. Pandemije gripe so redkejši pojav od epidemij in se pojavljajo v daljših časovnih razmakih (Potter, 2004). Med pandemijo je v primerjavi z epidemijo število žrtev večje tudi med mlajšimi starostnimi skupinami (Simonsen, 1999).



Slika 3: Antigeni premik.

### 2.3.3 Naravni rezervoarji virusov influence

Virusi influence A povzročajo okužbe tako pri človeku kot tudi pri različnih živalskih vrstah: konjih, prašičih, morski sesalcih, ptičih ipd. (slika 4). Študije so pokazale, da so divje vodne ptice najverjetnejši naravni rezervoar vseh virusov influence A (Webster in sod., 1992). V njihovem prebavnem traktu ali blatu je bilo prepoznanih vseh 16 podtipov HA ter vseh 9 do danes znanih podtipov NA (Sandrock in Kelly, 2007). Virusni ptičje gripe so z vodnimi pticami v popolnem ravnovesju in ne povzročajo bolezni. Lahko pa se iz divjih ptic prenesejo na občutljivo domačo perutnino ter povzročajo bolezen. Prilagoditev virusa na novega gostitelja omogoči uspešno širjenje okužbe. To je običajno rezultat genetskih sprememb (Werner in Harder, 2006). Virusni t. i. ptičje gripe predstavljajo skupek genov in nudijo vso genetsko raznolikost, ki je potrebna za pojav novega pandemičnega seva pri ljudeh (Webster in sod., 1992).



**Slika 4:** Gostitelji virusov influence A (Webster in sod., 1992: 156).

### 2.3.3.1 Ptičja gripa

Visoko patogeno ptičjo gripo so kot nalezljivo bolezen ptic ter perutnine prvič opisali v Italiji leta 1878 (Werner in Harder, 2006). V zadnjem desetletju so številni primeri okužbe ljudi z virusi ptičje gripe vzpodbudili upravičeno zaskrbljenost svetovne javnosti (Nicholson in sod., 2003).

Iz številnih epidemioloških podatkov je razvidno, da je Jugovzhodna Azija najverjetnejši vir novih podtipov virusa influence A. Nastanek in širjenje novih podtipov omogoča visoka gostota prebivalstva, tesno sobivanje ljudi z domačimi, divjimi pticami ter prašiči (Nicholson in sod., 2003). Prav prašiči naj bi bili ključni člen pri oblikovanju novih podtipov virusa gripe A. Epitelijske celice traheje prašiča vsebujejo receptorje za viruse influence človeka, kot tudi za viruse ptičje gripe (Wong in Yuen, 2006).

Leta 1997 se je v Hong Kongu pojavil prvi primer okužbe z visoko patogenim virusom ptičje gripe H5N1 pri človeku. V naslednjih letih so izbruhi obolenja z visoko patogenim virusom H5N1 povzročili veliko ekonomsko škodo predvsem v perutninski industriji. Z osamitvijo virusa so dokazali, da se je tekom časa genetsko spreminjal, kar mu je omogočilo, da je postal visoko patogen tudi za divje vodne ptice (Lipatov in sod., 2004). Prav patogenost virusa H5N1 za vodne ptice selivke je povzročila veliko zaskrbljenosti,



zaradi možnosti širjenja virusa na druga geografska področja (Abdel-Ghafar in sod., 2008). Leta 2003 so potrdili prvi primer prenosa okužbe z virusom ptičje gripe H5N1 s človeka na človeka (Lipatov in sod., 2004). Od leta 2004 so se izbruhi bolezni pri perutnini in divjih pticah iz Jugovzhodne Azije razširili na druga geografska področja, tudi v države Evropske unije. Primeri okužbe se vseskozi pojavljajo tudi pri ljudeh, predvsem v Aziji. Ljudje obolevajo za hudo obliko pljučnice, ki hitro napreduje v dihalno stisko ter do odpovedi več organov. Najpogostejši vzrok prenosa okužbe na človeka je tesen stik obolelega z okuženo domačo perutnino ali divjimi pticami. V redkih primerih prihaja do prenosa virusa H5N1 s človeka na človeka (Sandrock in Kelly, 2007; Abdel-Ghafar in sod., 2008).

Od leta 2003 do marca 2009, je bilo laboratorijsko dokazanih 409 primerov okužbe z virusom ptičje gripe H5N1, od tega se je 256 primerov končalo s smrtjo. Največ primerov so potrdili v Indoneziji, Vietnamu, Egiptu in Kitajski (WHO ... , 2009). V Sloveniji so prvi primer ptičje gripe odkrili pri labodu leta 2006. Primerov okužbe z visoko patogenim virusom H5N1 pri ljudeh ni bilo (Sporočilo za ... , 2006).

V zadnjih 10 letih so pri ljudeh dokazali okužbe tudi z drugimi virusi ptičje gripe, in sicer H9N2, H7N3 ter H7N7 (Lipatov in sod., 2004). Leta 2003 je na Nizozemskem in v sosednjih državah visoko patogeni podtip H7N7 povzročil velik izbruh bolezni med perutnino. Z virusom so se okužili tudi ljudje, in sicer pri odstranjevanju obolelih živali; v nekaterih primerih je prišlo do prenosa bolezni med družinskimi člani. Pri okuženih so se pojavili gripi podobni bolezenski znaki ter vnetje očesne veznice, vendar je bil potek bolezni na splošno blag (Gillim-Ross in Subbarao, 2006).

Pojavu pandemije se v prihodnosti ne moremo izogniti. Čas, obseg in izvor je nemogoče napovedati. Nenehno pojavljanje virusa H5N1 na različnih geografskih območjih ter endemična prisotnost virusa pri perutnini ga uvršča med možne kandidate povzročitelja pandemije. Znanstveniki so dokazali spremembe v genetskem zapisu virusa H5N1, a nobena od teh sprememb ni povečala njegove zmožnosti za širjenje med ljudmi. Virus H5N1 ostaja patogen ptic, ki je na ljudi slabo prilagojen (Peiris in sod., 2007). Trenutno bistveno večji pandemični potencial izkazuje virus nove gripe H1N1, ki se je marca 2009 začel širiti iz Srednje Amerike. Izkazalo se je, da je nov virus nastal s prerazporeditvijo

genskih odsekov prašičjega, humanega in ptičjega virusa influence A. Virus izkazuje spremembe v obeh površinskih glikoproteinih in se uspešno širi med ljudmi, a zaenkrat ni bistveno virulentnejši od sezonskega seva H1N1 (Gallagher, 2009).

### **2.3.4 Epidemiološko spremljanje gripe**

#### **2.3.4.1 V svetu**

Vsako leto zboli za gripo ogromno število ljudi po vsem svetu. Gripa vsako leto terja okoli 300 000 do 500 000 žrtev, za težjo obliko bolezni zboli okoli 3 do 5 milijonov ljudi (Kamps in Reyes-Terán, 2006). Vsakoletne epidemije privedejo do večje odsotnosti otrok od pouka, odsotnosti ljudi z dela in s tem manjše produktivnosti. Povečajo se stroški bolnišničnega zdravljenja. S tem si lahko razlagamo dejstvo, da ima gripa ogromen vpliv na svetovno gospodarstvo in ekonomijo (Simonsen, 1999). Pri zmanjševanju stroškov, ki jih gripa povzroča, ima velik pomen preprečevanje bolezni s cepljenjem.

Epidemiološko spremljanje gripe omogoča razpoznavo kroženja virusov influence v populaciji. Svetovna zdravstvena organizacija izvaja stalen nadzor nad gibanjem virusov v svetu od leta 1947. To omogoča sledenje in identifikacijo novih podtipov in sevov virusa. Na podlagi izsledkov se vsako leto spreminja sestava cepiva proti gripi. Pri epidemiološkem spremljanju ima velik pomen izmenjava podatkov med referenčnimi laboratoriji za gripo različnih držav. Ti posredujejo podatke Evropski mreži za gripo (EISS, angl. European Influenza Surveillance Scheme) ter SZO (Svetovni zdravstveni organizaciji). Stalen nadzor se izvaja tudi nad kroženjem in pojavljanjem živalskih sevov virusa influence (Kuszewski in Brydak, 2000).

#### **2.3.4.2 V Sloveniji v sezoni 2007/2008**

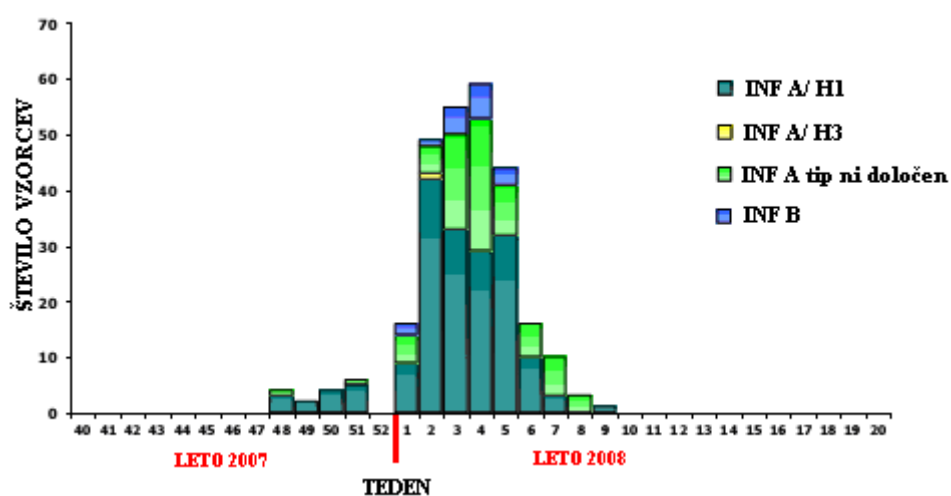
V Sloveniji vsako leto zaradi gripe zboli približno 60.000 ljudi. Epidemija gripe je v preteklosti zajela tudi že več kot 200.000 ljudi (Dolenc, 2005).

Gripa je bolezen, ki jo je v skladu z Zakonom o nalezljivih boleznih potrebno prijaviti (Zakon o nalezljivih ... , 2006 ). Izkazalo se je, da ta sistem spremljanja nalezljivih boleznih

ni najboljši, saj je število prijavljenih primerov običajno bistveno nižje od dejanskega. Leta 1999 je Inštitut za varovanje zdravja RS (IVZ RS) vzpostavil mrežo za epidemiološko ter virološko spremljanje gripe. V mreži sodelujejo zdravniki osnovnega zdravstvenega varstva, območni zavodi za zdravstveno varstvo ter nekatere bolnišnice. Virološko spremljanje gripe v vzorcih dihal izvaja Laboratorij za viruse IVZ RS, ki je nacionalni referenčni laboratorij za gripo. Laboratorij sodeluje znotraj Globalne mreže za spremljanje gripe pri SZO ter v Evropski mreži laboratorijev za spremljanje gripe v okviru EISS. Naloga laboratorija je zaznavanje kroženja virusa gripe v populaciji, genetsko določevanje tipa in podtipa ter osamitev virusa iz kužnin (Ministrstvo za ... , 2008).

Sezona gripe v letu 2007 in 2008 je bila ena lažjih sezon v zadnjih letih. Okužbe z virusi influence A so zabeležili med 47. tednom 2007 in 9. tednom 2008, največjo število okužb so dokazali med 2. in 4. tednom 2008 (slika 5). Z molekularnimi metodami so ugotovili prisotnost nukleinske kisline virusa influence A v 252 (13 %) od 1898 preiskanih vzorcev dihal. S tipiziranjem so ugotovili, da je v tej sezoni prevladoval podtip H1N1, podtip H3N2 pa so določili le v enem vzorcu (Kraigher in sod., 2008).

Epidemiološki podatki spremljanja influence A v Sloveniji se v sezoni 2007/2008 niso bistveno razlikovali od večine drugih evropskih držav, ki so vključene v EISS (Kraigher in sod., 2008).



**Slika 5:** Pojavljanje virusov influence tipa A in B po tednih, v obdobju med oktobrom 2007 in majem 2008 (Kraigher in sod., 2008: 27).

## 2.4 PATOGENEZA IN KLINIČNA SLIKA GRIPE

Virus influence povzroča okvaro migetalčnih epitelijskih celic v sapniku in zgornjih dihalnih poteh. Dodatno škodo na epitelu povzroča imunski odgovor obolelega (Gavin in Thomson, 2003). Če se virus razširi v spodnje dihalne poti, se v prizadetem delu pojavijo krvavitve in hialine membrane (Yeldandi in Colby, 1994).

Potek bolezni je odvisen od imunskega statusa bolnika in podtipa virusa influence A, ki gripo povzroča (Murray in sod., 2005). Podtip H1N1 povzroča lažjo obliko bolezni od podtipa H3N2, kateremu pripisujejo 80 % vseh smrtnih primerov. Najbolj ogroženi za razvoj zapletov so starejši od 65 let, otroci mlajši od 1 leta, kronični bolniki, nosečnice ter imunsko oslabljeni (Rothberg in sod., 2008).

Za gripo je značilna kratka inkubacijska doba, ki traja 1 do 4 dni. Bolezen se začne nenadno s povišano telesno temperaturo, mrazenjem, glavobolom, močnimi bolečinami v mišicah in križu, suhim kašljem in rinitisom. Suh kašelj spremljajo bolečine za prsnico in pekoče bolečine v žrelu (Cox in Subbarao, 1999). Sistemski znaki okužbe trajajo običajno 4 do 8 dni, kašelj in slabo počutje pa lahko tudi do 2 tedna. Bolezen običajno mine sama od sebe (Hoffmann in Kamps, 2006).

Pri starejših ljudeh in kroničnih bolnikih se klinični znaki pojavijo v hujši obliki, potek bolezni je dolgotrajen z zapleti in pogosto je potrebno bolnišnično zdravljenje. Pri kroničnih bolnikih povzroči gripa poslabšanje že obstoječe bolezni (Harper in sod., 2009). Najtežja oblika gripe poteka kot primarna pljučnica, pogosto pa virusni okužbi sledi sekundarna bakterijska okužba (Murray in sod., 2005). Otroci pogosto zbole vajo za gripo. Starejši otroci jo lažje prebole vajo kot mlajši. Pri zelo majhnih otrocih pride pogosto, poleg običajnih znakov in povišane telesne temperature, do bronhilitisa, krupa, vnetja srednjega ušesa, slabosti, bruhanja, diareje in vročinskih krčev (Murray in sod., 2005; Rothberg in sod., 2008).

Najpogostejši zapleti, ki lahko spremljajo okužbo z virusom influence so: bakterijska pljučnica, miozitis, mioglobinurija, vnetje srčne mišice, vnetje osrčnika, Reyev sindrom in nevrološki zapleti (Rothberg in sod., 2008).

## 2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE GRIPE

Zdravljenje gripe brez zapletov je simptomatsko. Bolnikom priporočajo počitek, povišano temperaturo znižujejo z antipiretiki, bolečine blažijo z analgetiki. Pri sumu na zaplete, ki so bakterijskega izvora, priporočajo jemanje antibiotikov (Hoffmann in sod., 2006).

Pri ljudeh z večjim tveganjem za razvoj hude oblike gripe z zapleti je običajno potrebno protivirusno zdravljenje. Učinkovitost zdravil je pogojena s pričetkom zdravljenja v 48 urah po začetku bolezni. Zdravila proti influenci olajšajo in skrajšajo potek bolezni ter zmanjšajo pojavljanje zapletov. Uporablja pa se jih tudi kot preventivna sredstva. (Hoffmann in sod., 2006). Za zdravljenje gripe so na voljo tri skupine protivirusnih spojin: zaviralci ionskih kanalčkov M2 (amantadin in rimantadin), zaviralci nevraminidaze (oseltamivir in zanamivir) ter zaviralci monofosfatne dehidrogenaze (Memoli in sod., 2008).

Za preprečevanje gripe je najbolj učinkovito cepljenje. Ker je virus influence antigensko zelo spremenljiv, je potrebno neprestano izdelovati nova cepiva s trenutno prevladujočimi virusnimi sevi. Cepivo proti gripi je trivalentno in vsebuje najnovejše seve virusa gripe tipa A (H1N1, H3N2) ter sev tipa B (Memoli in sod., 2008). V Sloveniji je cepljenje proti influenci neobvezno, izvaja se vsako jesen. Priporočljivo je za skupine ljudi z večjim tveganjem. Če so podtipi virusov gripe dobro izbrani, s cepljenjem dosežemo zaščito pri 70 do 90 % cepljenih. Pri majhnih otrocih ter starejših od 65 let je učinek cepiva slabši, vendar prepreči težji potek bolezni in zaplete. Zaščita traja 3 do 6 mesecev (Koren, 2005).

## 2.6 DIAGNOSTIKA GRIPE

### 2.6.1 Klinična diagnostika

Diagnozo gripe je na podlagi bolezenskih znakov težko postaviti. Klinična slika je običajno zelo podobna okužbam z drugimi respiratornimi virusi (Petric in sod., 2006). Med sezono gripe je verjetnost pravilne klinične diagnoze večja. Zaradi tega je pomembna seznanitev splošnih zdravnikov o začetku širjenja virusov influence v določeni populaciji (Gavin in Thomson, 2003). V sezoni gripe lahko predvidevamo za obolelega vsako osebo,

ki ima povišano telesno temperaturo in pri kateri so se pojavili znaki akutne okužbe dihal. Še posebej pozorni pa moramo biti na ljudi s tveganjem za razvoj hude oblike gripe z zapleti, ki kažejo znake okužbe dihal (Harper in sod., 2009).

## 2.6.2 Laboratorijska diagnostika

V preteklosti je bil pomen laboratorijske diagnostike okužbe z virusom influence vprašljiv, predvsem zaradi tega, ker je večina okužb samoomejujočih in poteka brez zapletov. Obstoječe metode so bile slabo občutljive in dolgotrajne, primanjkovalo pa je tudi učinkovitih protivirusnih zdravil (Petric in sod., 2006). Danes laboratorijska diagnostika, zaradi večjih možnosti zdravljenja, epidemiološkega spremljanja krožečih podtipov in sevov virusa influence ter razvoja novih, hitrih in občutljivejših metod, postaja čedalje bolj pomembna (Dwyer in sod., 2006). Hitri in občutljivi laboratorijski testi so pomembni za pravočasno in ustrezno protivirusno zdravljenje, za izboljšanje prognoze bolezni pri najbolj ogroženih ljudeh, preprečevanje izbruhov bolezni ter za zmanjševanje stroškov, ki nastanejo kot posledica neustrezne rabe antibiotikov in dolgotrajnega bolnišničnega zdravljenja (Harper in sod., 2009).

V smernicah IDSA (angl. Infectious Diseases Society of America) so navedena priporočila, katere bolnike bi bilo potrebno v času sezone gripe testirati na okužbo z virusi influence. To so predvsem:

- imunsko oslabei bolniki, z znaki akutne okužbe dihal ter povišano telesno temperaturo,
- osebe s tveganjem za razvoj hude oblike bolezni in zapletov, ki kažejo znake okužbe dihal ter povišano telesno temperaturo, v petih dneh po začetku bolezni,
- osebe vseh starostnih skupin na zdravljenju v bolnišnici, z znaki okužbe dihal in povišano telesno temperaturo (vključno z bolniki z izven bolnišnice pridobljeno pljučnico),
- starejše osebe in dojenčki, ki kažejo znake sepse oziroma imajo povišano telesno temperaturo neznanega izvora,
- otroci s povišano telesno temperaturo in znaki okužbe dihal, ki so jih pripeljali k zdravniku,

- osebe vseh starostnih skupin, ki so razvili znake okužbe dihal po sprejemu v bolnišnico,
- pred začetkom bolezni, zdrave osebe brez tveganja, testiramo v epidemiološke namene.

Med letom naj bi testirali vse osebe, ki so epidemiološko povezane s kakršnim koli izbruhom gripe, pri katerih se pojavijo znaki vročinske okužbe dihal. Dokazovanje okužbe je smiselno v petih dneh po pojavu bolezenskih znakov (Harper in sod., 2009).

Primernost laboratorijske metode za dokazovanje virusov influence je odvisna predvsem od hitrosti metode. Testiranje vzorcev obolele osebe je smiselno, če nam metoda poda rezultate v času, v katerem lahko še vedno učinkovito in ustrezno oskrbimo bolnika. Seveda pa je pri analizi rezultatov potrebno upoštevati še veliko drugih dejavnikov, kot so specifičnost in občutljivost metode, razširjenosti virusa v določeni populaciji, morebitne sočasne okužbe z drugimi respiratornimi virusi ipd. (Harper in sod., 2009).

#### 2.6.2.1 Osamitev virusa

Osamitev virusa gripe na klasičnih celičnih kulturah ali kulturah "shell vial" je metoda, ki jo odlikuje visoka občutljivost in specifičnost. Za osamitev virusa influence se najpogosteje uporabljajo celične kulture iz celic pasjih ali opičjih ledvic (Petric in sod., 2006). V okuženih celicah pride do pojava citopatskih učinkov (CPU). Ti se običajno pojavijo v 5 dneh inkubacije inokulirane celične kulture (Dwyer in sod., 2006). Metoda osamitve virusa je dolgotrajna in se običajno ne uporablja v vsakodnevnem testiranju vzorcev. Kljub temu ima še vedno velik pomen pri pripravi cepilnih sevov, potrditvi nejasnih oziroma negativnih rezultatov manj občutljivih metod ter pri prepoznavanju novih podtipov ali zelo spremenjenih sevov virusa gripe A (Dwyer in sod., 2006; Harper in sod., 2009).

#### 2.6.2.2 Posredne metode

Za diagnostiko gripe so serološke metode manj pomembne. Dokazovanje protiteles v bolnikovem serumu je pomembno predvsem za epidemiološke študije in za ovrednotenje imunskega statusa bolnika po cepljenju. Protitelesa se v bolnikovem serumu pojavijo v drugem tednu po začetku bolezni in dosežejo najvišjo vrednost v četrtem tednu. Serološko dokazovanje bolezni temelji na primerjavi količine protiteles med bolnikovim akutnim serumom, ki je odvzet v začetku bolezni ter rekonvalescentnim serumom, ki je odvzet 14 do 21 dni kasneje. Svežo okužbo potrdi štirikraten porast količine specifičnih protiteles proti virusu influence (Dwyer in sod., 2006).

#### 2.6.2.3 Neposredne metode

Neposredno dokazovanje virusnih antigenov v kužninah, s specifičnimi protitelesi označenimi s fluorokromi, je ena najbolj uporabljanih ter zanesljivih metod v kliničnih laboratorijih za dokazovanje virusnih okužb dihal. Postopek je neposreden ali posreden. Za dokazovanje okužb z virusi influence A se najpogosteje uporablja metoda direktne imunofluoresce (Petric in sod., 2006). Metoda je hitra, sorazmerno enostavna, specifična ter v primerjavi z osamitvijo virusa 60-100 % občutljiva. Slabost metode predstavlja subjektivna ocena rezultatov, zato je nujno, da jo izvaja izkušena oseba. Zelo pomembna je tudi kvaliteta testiranih vzorcev (Gavin in Thomson, 2003).

Za neposredno diagnostiko okužb z virusi influence so na voljo tudi hitri komercialni testi. Na tržišču je prisotnih šest vrst testov, ki omogočajo ločevanje med virusi influence tipa A in B. Testi temeljijo na dokazu virusnih nukleoproteinov, ki predhodno reagirajo s specifičnimi monoklonskimi protitelesi (Dwyer in sod., 2006). Rezultati vidni na imunokromatografskem filmu v 10 do 30 minutah po dodajanju vzorca. Uporaba teh testov je omejena, zaradi spremenljive in običajno nizke občutljivosti, na katero vpliva starost bolnika, vrsta vzorca, trajanje bolezni in najverjetneje tudi tip virusa (Dwyer in sod., 2006; Harper in sod., 2009). Hitri antigenski testi naj bi služili predvsem zdravniku za lažjo odločitev pri izbiri ustreznega zdravljenja. Negativen rezultat hitrega testa ne izključuje gripe in ga je potrebno potrditi z občutljivejšimi laboratorijskimi metodami (Harper in sod., 2009).



#### 2.6.2.4 Molekularne metode

Trenutno najbolj specifična in občutljiva metoda, za dokazovanje okužb z virusi influence, je dokazovanje virusne nukleinske kisline v vzorcih dihal z RT-PCR (Petric in sod., 2006; Harper in sod., 2009). Z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo pomnoževanje specifičnih genov virusa influence, lahko razlikujemo med tipi, podtipi in celo sevi virusa. Na občutljivost metode ima kvaliteta vzorca, časa odvzema ter prenos vzorca manjši vpliv kot pri ostalih metodah (Dwyer in sod., 2006). Virusna RNA je v vzorcu dokazljiva dlje časa, kot je možna osamitev virusa v celični kulturi. Metoda RT-PCR omogoča enostavnejšo potrditev okužbe pri imunsko oslabelih bolnikih, katerih vzorci spodnjih dihal vsebujejo običajno nizko količino virusa (Petric in sod., 2006). Metoda je razmeroma hitra, saj lahko rezultate pričakujemo v nekaj urah. Zaradi visoke občutljivosti je primerna kot potrditvena metoda (Manojkumar in Mrudula, 2006; Harper in sod., 2009). Slabost RT-PCR je v tem, da sama izvedba zahteva izobražen kader in ustrezno opremljen laboratorij. Metoda je zelo draga in si jo večina manjših laboratorijev ne more privoščiti, na ceno preiskave pa ključno vpliva tudi zahtevan čas do izvida ter število testiranih vzorcev (Gavin in Thomson, 2003).

Novejše različice PCR predstavljajo pomemben korak k razvoju virusne laboratorijske diagnostike. Omogočajo hkratno dokazovanje različnih respiratornih virusov v istem vzorcu ter pomnoževanje virusne nukleinske kisline in ovrednotenje njene količine (Potter, 2004).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili 238 vzorcev, ki so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v mesecu januarju in februarju 2008.

Najpogostejši vzorci so bili brisi nosnožrelne sluznice ter brisi žrela, sledili so aspirati traheje (AT), bronhoalveolarni izpirki (BAL) ter bris nosu. Brisi so bili odvzeti aseptično in preneseni v laboratorij v transportnem gojišču za viruse. Aspirati traheje in BAL so bili preneseni v plastičnih ali steklenih sterilnih posodicah oziroma epruvetah, brez dodanega transportnega gojišča. V laboratoriju je nato sledila obdelava kužnin.

V redni diagnostiki je bilo 236 vzorcev testiranih na prisotnost antigenov respiratornih virusov: influence A in B, parainfluence 1, 2 in 3, adenovirusov ter respiratornega sincicijskega virusa. Rezultati DIF so shranjeni v laboratorijskem informacijskem sistemu. Le-te smo uporabili za primerjavo z rezultati testiranj z metodo RT-PCR v realnem času. Do našega testiranja so bili vsi vzorci shranjeni pri temperaturi -20 °C.

#### 3.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE

- komora za varno delo
- stojalo za epruvete
- epruvetke
- centrifuga (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga vorteks (Fisher Scientific, Leicestershire, Velika Britanija)
- pipete z območjem pipetiranja 2-20 µl, 10-100 µl in 50-200 µl (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- nastavki za pipete
- zaščitne rokavice
- natrijev hipoklorit
- raztopina za odstranjevanje nukleinskih kislin

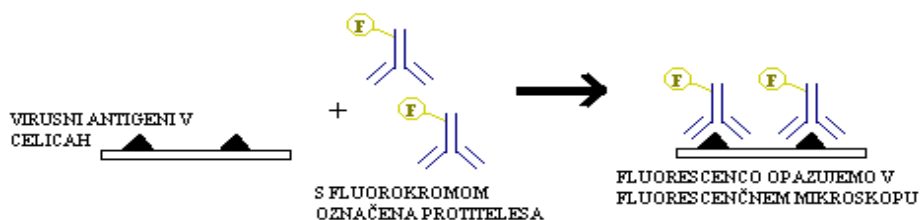
- epruветke za PCR
- ploščice za PCR
- hladilno stojalo za ploščico PCR
- aparatura StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA), ki omogoča pomnoževanje nukleinske kisline v realnem času
- aparatura za izolacijo nukleinskih kislin MagNA Pure Compact (Roche, Applied Science, Basel, Švica).

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Direktna imunofluorescenca

Metodo DIF bomo samo omenili, saj smo pri delu uporabili le rezultate rutinskega testiranja kliničnih vzorcev na okužbo z respiratornimi virusi.

Neposredno dokazovanje virusov v kužnini z metodo direktne imunofluorescence temelji na dokazovanju virusnih antigenov s pomočjo specifičnih protivirusnih protiteles (slika 6). Pri tem se uporabljajo zelo specifična monoklonska protitelesa, ki so označena s fluorescentnimi barvili ali fluorokromi. Po vzdraženju fluorokromov s svetlobo kratke valovne dolžine le-ti oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine, ki jo lahko opazujemo v fluorescenčnem mikroskopu (Marin, 2005). Z uporabo monoklonskih protiteles, ki so označena z različnimi fluorokromi, lahko v istem vzorcu dokažemo različne povzročitelje (Gavin in Thomson, 2003).



**Slika 6:** Shematski prikaz metode direktne imunofluorescence za dokazovanje virusnih antigenov v okuženih celicah.

Občutljivost metode je odvisna od števila okuženih epitelijskih celic v vzorcu. V laboratoriju je potrebno vzorec najprej ustrezno obdelati. Kužnine dihal običajno vsebujejo

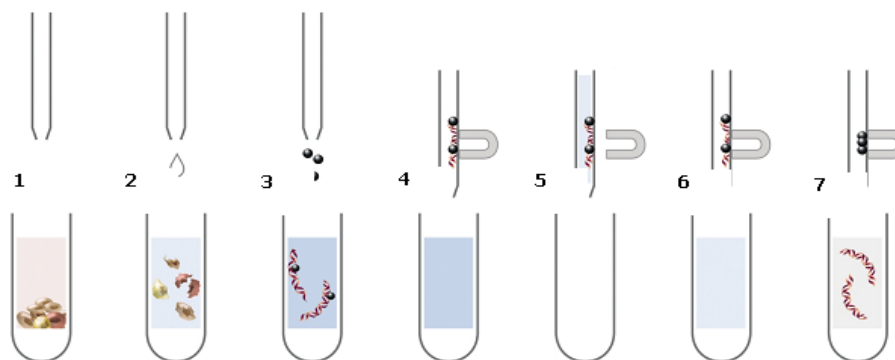
veliko sluzi, ki jo je potrebno odstraniti. Celice lahko zgostimo s pomočjo centrifugiranja. Za nadaljnjo testiranje uporabimo le sediment na dnu epruvete. Uporaba predmetnih stekel z označenimi manjšimi polji omogoča manjšo porabo dragih reagentov ter hitrejšo analizo vzorcev (Leland, 1996).

### **3.3.2 Izolacija celokupne nukleinske kisline**

Izolacijo celokupne nukleinske kisline iz vzorcev smo izvedli na aparaturi MagNA Pure Compact (Roche, Applied Science, Basel, Švica). Pri tem smo uporabili MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Applied Science, Mannheim, Nemčija), ki vsebuje:

- 32 kartuš z reagenti (proteinaza K, litični pufer, magnetni delci, spiralni pufri ter eleucijski pufer)
- 32 nastavkov za pipete
- 35 epruvet za vzorce
- 35 eleucijskih epruvet
- 35 pokrovčkov za eleucijske epruvete

Reagenti so zanesljiv in dragocen pripomoček za izolacijo popolnoma prečiščene genomske DNA, kot tudi virusne nukleinske kisline iz različnih bioloških vzorcev. Aparatura MagNa Pure Compact omogoča hitro in popolnoma avtomatizirano izvedbo vseh stopenj izolacije nukleinske kisline (Kirchgesser in sod., 2003). Izolacija temelji na uporabi tehnologije magnetnih delcev. Nukleinska kislina iz vzorca se veže na magnetne delce iz magnetita oziroma sljude, ki so prekriti s steklom. Trajni magnet, ki se nahaja izven epruvete, ustvari magnetno polje in omogoči premik magnetnih delcev z vezano nukleinsko kislino proti njemu (slika 7) (Berensmeier, 2006).



**Slika 7:** Princip izolacije nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Kirchgesser in sod., 2003: 12). 1. vzorec, 2. dodatek litičnega pufra in proteinaze K povzroči razgradnjo celic in beljakovin, 3. vezava nukleinske kisline na površino magnetnih delcev, 4. ločitev magnetnih delcev z vezano nukleinsko kislino, 5. in 6. spiranje s spiralnim pufrom, 7. sprostitvev nukleinske kisline pri visoki temperaturi, z eleucijskim pufrom

Tehnologija magnetnih delcev prinaša vrsto prednosti pred klasičnimi metodami izolacije. Nukleinsko kislino lahko izoliramo iz predhodno neobdelanega kliničnega vzorca, izolacija je enostavna in ne zahteva centrifugiranja (Berensmeier, 2006). Aparatura omogoča izolacijo celokupne nukleinske kisline iz osmih vzorcev naenkrat, kar zahteva le 25 minut. Avtomatizacija metode poleg tega zagotavlja dobro ponovljivost ter preprečuje navzkrižno kontaminacijo vzorcev (Kirchgesser in sod., 2003). Izolirana nukleinska kislina izkazuje visoko stopnjo čistosti (Waltenberger in sod., 2004).

Vzorci iz katerih smo izolirali celokupno nukleinsko kislino so bili predhodno shranjeni pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V biološki komori za varno delo, ki smo jo očistili z natrijevim hipokloritom, smo vzorce najprej odtalili in jih dobro premešali na mešalu, da so se celice enakomerno razporedile. Nato smo v 1,5 ml epruvete pipetirali po 200  $\mu\text{l}$  vsakega vzorca. Aparaturo za izolacijo smo napolnili s potrebnimi pripomočki ter kartušami z reagenti. Reagente smo pred uporabo dobro pretresli, da so se magnetni delci v raztopini, ki imajo veliko afiniteto do sedimentacije, enakomerno porazdelili. Aparatura je opremljena s programsko opremo, katero je bilo potrebno ustrezno nastaviti. Izbrali smo protokol »DNA blood«, volumen vzorca 200  $\mu\text{l}$  in eleucijski volumen 100  $\mu\text{l}$ . Pripravljene vzorce smo skupaj s stojalom previdno namestili v aparaturo. Po končani izolaciji smo eleucijske epruvete pokrili, ustrezno označili ter jih shranili pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.3 Pomnoževanje virusne nukleinske kisline

#### 3.3.3.1 Začetni oligonukleotidi

Izbira začetnih oligonukleotidov je ključna pri pomnoževanju virusne nukleinske kisline. Začetne oligonukleotide smo izbrali na podlagi članka *Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children*, avtorjev Kuypers in sodelavcev, ki je bil objavljen v reviji *Journal of Clinical Microbiology* leta 2006. Z začetnimi oligonukleotidi smo pomnoževali regijo na genskem odseku 7, ki vsebuje zapis za matrično beljakovino M1 in beljakovino M2. Regija je tipsko specifična in zelo ohranjena med sevi virusa influence A (Kuypers in sod., 2006)

Pri reakciji RT-PCR v realnem času smo uporabili začetne oligonukleotide (TIB MOLBIOL, Berlin, Nemčija), ki so bili pripravljene v koncentraciji 25  $\mu$ M. Z njimi smo pomnoževali 82 baznih parov dolg tarčni odsek (slika 8).

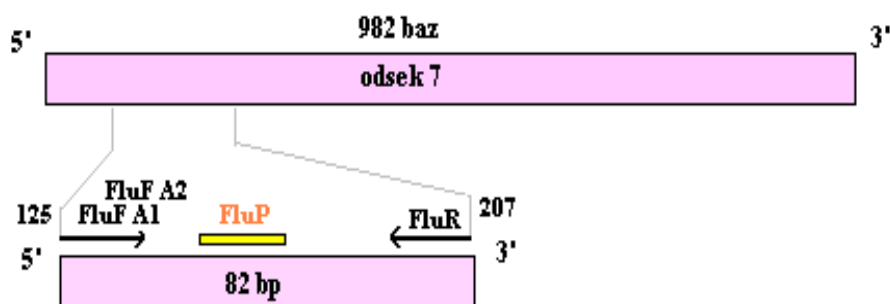
- o 5' proti 3' začetni oligonukleotidi

**FluF A1** TCATGGAGTGGCTAAAGACAAGAC

**FluF A2** TCATGGAATGGCTAAAGACAAGAC

- o 3' proti 5' začetni oligonukleotidi

**FluR** GGCACGGTGAGCGTGAA



Slika 8 : Shematski prikaz genskega odseka 7 z mesti pripenjanja začetnih oligonukleotidov in sonde.

### 3.3.3.2 Sonda

Sondo smo izbrali na podlagi prej omenjenega članka. Sonda FluP (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA) je bila pripravljena v koncentraciji 25  $\mu$ M.

**FluP** TCACCTCTGACTAAGGG

Sonda FluP je bila na 5' koncu označena s fluoroforom 6-FAM (6-karboksi-fluorescein) in na 3' koncu z dušilcem fluorescence ter molekulo MGB (angl. minor groove binder).

Začetne oligonukleotide ter sondo smo shranjevali pri temperaturi 4 °C.

### 3.3.3.3 Kontrole

Pri pomnoževanju tarčne nukleinske kisline virusa influence A z metodo RT-PCR v realnem času smo uporabili pozitivno in negativno kontrolo. Obe kontroli smo vključili v vse reakcije, ki smo jih izvedli.

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili vzorce, v katerih je bila v redni diagnostiki ugotovljena prisotnost antigenov virusa influence A in vzorce, ki smo jih dobili v testiranje iz servisa QCMD za nadzor kakovosti dela v laboratoriju. Ti vzorci so bili pozitivni na nukleinsko kislino virusa influence A.

Kot negativno kontrolo smo uporabili vodo, ki je namenjena delu z molekularnimi metodami.

### 3.3.3.4 Verižna reakcija s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR) v realnem času

#### 3.3.3.4.1 Teoretične osnove

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) je ena najpomembnejših metod v raziskovalnih laboratorijih, čedalje večji pomen pa pridobiva tudi v diagnostičnih laboratorijih, kjer je bila sprejeta kot zlati standard za določanje nukleinskih kislin v kliničnih vzorcih. Metoda temelji na pomnoževanju ohranjenega

zaporedja nukleotidov s pomočjo kratkih začetnih oligonukleotidov. Ti se pripnejo na končna dela tarčnega zaporedja in delujejo kot substrat za termostabilen encim polimerazo DNA, ki omogoča nastanek komplementarnega zaporedja z dodajanjem deoksinukleotidov. Pri reakciji se najpogosteje uporablja polimerazo *Taq* iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (Mackay in sod., 2002).

Klasični PCR omogoča pomnoževanje le deoksiribonukleinske kisline (DNA, angl. deoxyribonucleic acid). Različica metode, ki omogoča pomnoževanje tudi RNA, se imenuje PCR z reverzno transkriptazo (RT). RT-PCR je najbolj občutljiva metoda za dokaz in kvantifikacijo mRNA (Mackay, 2004).

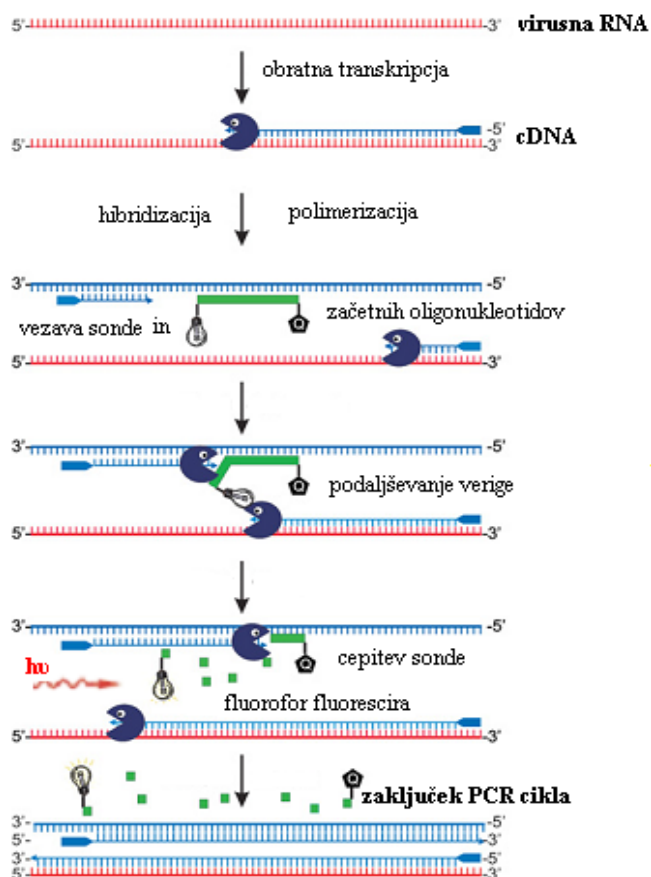
V teoriji se potek reakcije RT-PCR bistveno ne razlikuje od klasične reakcije PCR (slika 9). RT-PCR se začne s stopnjo prepisa RNA v komplementarno verigo DNA (cDNA, angl. complementary DNA), s pomočjo encima reverzna transkriptaza (Bustin in Mueller, 2005). Prepis poteka pri temperaturi 42-55 °C. Nastane dvovijačni hibrid iz cDNA in RNA. Slednjo razgradi reverzna transkriptaza, ki ima tudi aktivnost RNAze H. Polimeraza DNA nato prepíše cDNA v dvovijačno cDNA (Karp, 2008). Sledi pomnoževanje dvovijačne cDNA po običajni poti reakcije PCR.

PCR obsega tri stopnje. Za vsako stopnjo je značilna točno določena temperatura inkubacije:

- denaturacija DNA pri temperaturi 90 °C,
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50-60 °C,
- podaljševanje verige pri temperaturi 70-78 °C.

Vse tri stopnje predstavljajo en temperaturni cikel PCR. Reakcijo PCR običajno sestavlja od 30 do 40 ponovitev temperaturnega cikla. Število kopij tarčnega nukleotidnega zaporedja se z vsakim ciklom eksponentno povečuje (Mackay, 2004; Karp, 2008). Reakcija RT-PCR poteka v računalniško vodeni aparaturi, ki omogoča inkubacijo reakcijske mešanice pri določenih temperaturah (Karp, 2008).





**Slika 9:** Shematski prikaz reakcije RT-PCR v realnem času (Bustin in Mueller, 2005: 367).

Prepoznavanje pridelkov pri klasičnem postopku PCR je zamudno in običajno temelji na uporabi gelske elektroforeze. V zgodnjih 90. letih prejšnjega stoletja so razvili novo različico PCR, in sicer PCR v realnem času. Metoda omogoča pomnoževanje tarčnega nukleotidnega zaporedja, hkrati spremljanje poteka pomnoževanja, prepoznavanje pridelkov ter kvantifikacijo tarčne nukleinske kisline v vzorcu z uporabo fluorescentnih oligonukleotidnih sond. Reakcija PCR v realnem času je izredno občutljiva in specifična. Omogoča prepoznavo manj kot petih kopij nukleinske kisline v vzorcu (Valasek in Repa, 2005). Poteka v zaprtem sistemu in tako znatno zmanjšuje nevarnost pojava kontaminacij okolja s pomnoženimi nukleinskimi kislinami ter same reakcijske mešanice. Reakcija je razmeroma enostavna za izvedbo in bistveno zmanjšuje čas, ki je potreben za dokaz pridelkov, v primerjavi s klasično metodo (Espy in sod., 2006).

Dokazovanje pridelkov PCR v realnem času delimo na nespecifično in specifično.

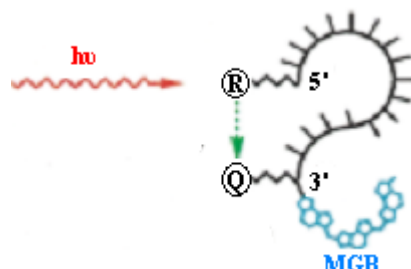
**Nespecifično** dokazovanje je najbolj osnovno, enostavno in najcenejše. Temelji na uporabi fluorescentnih barvil, kot so etidijev bromid, YO-PRO-1 in SYBR<sup>®</sup>green 1. Barvila se nespecifično vgradijo v dvovijačno DNA in močnejše fluorescirajo ob osvetlitvi s svetlobo določene valovne dolžine, kot v nevezani obliki (Mackay in sod., 2002).

**Specifično** dokazovanje pridelkov temelji na uporabi specifičnih kratkih oligonukleotidov ali sond, ki so označene s fluorofori (slika 8). Sonde se komplementarno vežejo s tarčnim zaporedjem. Delovanje sond temelji na prenosu fluorescenčne resonančne energije (FRET, angl. fluorescence resonance energy transfer) med fluoroforom in dušilcem (angl. quencher). Če se molekuli nahajata v neposredni bližini, fluorofor prejeta svetlobno energijo odda v obliki fluorescence, katero nato dušilec sprejme in odda v obliki toplote. Fluorescenco zaznamo le, če molekuli ne ležita v neposredni bližini (Mackay in sod., 2002).

Obstaja veliko različnih tipov sond, med katerimi se najpogosteje uporabljajo sonde TaqMan ali 5' nukleazne sonde. Njihovo delovanje temelji na 5' proti 3' endonukleazni aktivnosti polimeraze DNA. Sonda TaqMan je oblikovana tako, da ima na 5' koncu vezan fluorofor FAM in na 3' koncu vezan dušilec (6-karboksi-tetrametil-rodamin; TAMRA). Sonda se, po stopnji denaturacije nukleinske kisline, veže na tarčno nukleotidno zaporedje. Med podaljševanjem verige jo polimeraza DNA cepi. Posledično se fluorofor oddalji od dušilca, kar zaznamo kot povečanje jakosti fluorescence (Mackay in sod., 2002; Espy in sod., 2006).

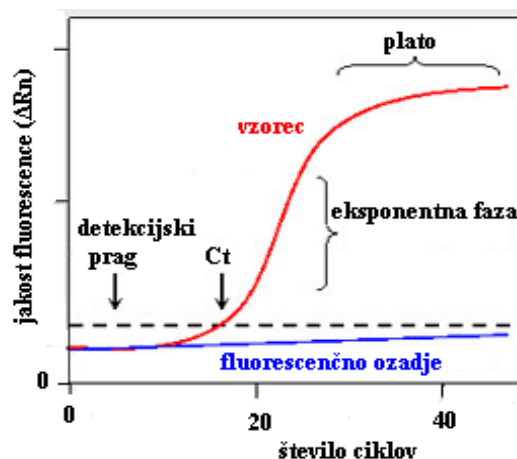
Novejša različica sonde TaqMan je sonda MGB (MGB, angl. minor groove binding oligoprobe) (slika 10). Sondi sta podobno oblikovani in se po delovanju bistveno ne razlikujeta. Sonda MGB ima na 3' koncu poleg dušilca še dodatno vezano molekulo MGB, ki se veže v mali graben enovijačne DNA. Molekula MGB na ta način močno poveča stabilnost vezave sonde na komplementarno verigo DNA. Prav ta lastnost omogoča, da so sonde MGB krajše v primerjavi z drugimi sondami (Di Trani in sod., 2006). Običajno so dolge od 12 do 17 nukleotidov (Mackay, 2004). Sonde MGB so zaradi svoje dolžine tudi bolj specifične in imajo višjo temperaturo tališča. Z uporabo sond MGB se zmanjša ozadje

fluorescence, ki nastane kot posledica nespecifične fluorescence. Te sonde so idealne za prepoznavanje enojnega nukleotidnega polimorfizma (Kutyavin in sod., 2000).



**Slika 10:** Sonda MGB (Kutyavin in sod., 2000: 658).

Sonde omogočajo dokazovanje pridelkov že med samim pomnoževanjem. Po vsakem ciklu reakcije PCR se količina odcepljenega fluorofora povečuje in posledično povzroči naraščanje jakosti fluorescence (Valasek in Repa, 2005). Spremljanje naraščanja jakosti fluorescence, ki je sorazmerna z naraščanjem količine pridelkov, nam omogoča računalniški program aparature za RT-PCR. Ta nam izriše krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev, od števila ciklov reakcije PCR (slika 11). Oblika krivulje spominja na sigmoidno rastno krivuljo. V začetnih ciklih je jakost fluorescence pod detekcijskim pragom merilne naprave in jo le-ta ne more razlikovati od fluorescence ozadja. Dokaz nastajanja pridelkov je možen, ko jakost fluorescence preseže ta prag. To je v eksponentni fazi krivulje. Točko oziroma cikel v katerem krivulja seka linijo fluorescenčnega praga imenujemo Ct (angl. threshold cycle) (Mackay in sod., 2002). Pomnoževanje tarčnega zaporedja poteka učinkovito le do določene meje, saj je omejeno s količino reagentov, ki se iz cikla v cikel porabljajo. Eksponentni fazi tako sledi plato reakcije. Zaradi tega, določitev količine začetne tarčne DNA ni možno z merjenjem količine pomnožene DNA ob koncu reakcije, pač pa z merjenjem nastajanja pridelkov v eksponentni fazi (Valasek in Repa, 2005). Višja kot je začetna količina kopij tarčne DNA, nižji bo Ct oziroma prej lahko opazimo signifikanten porast jakosti fluorescence (Bustin in Mueller, 2005).



**Slika 11:** Krivulja pomnoževanja tarčnega nukleotidnega zaporedja z metodo PCR v realnem času (What is ... , 2009).

Absolutno količino kopij tarčne DNA lahko določimo s pomočjo standardne krivulje, ki jo izrišemo na podlagi analize vzorcev s standardnimi količinami kopij tarčne DNA. Nato primerjamo vrednosti Ct analiziranega vzorca, s standardnimi vrednostmi Ct (Mackay in sod., 2002; Bustin in sod., 2005).

### 3.3.3.5 Enostopenjski RT-PCR v realnem času za virus influence A

Virusi influence A imajo enovijačni RNA genom, zato smo tarčni genski odsek pomnoževali z enostopenjskim RT-PCR v realnem času, pri katerem pride najprej do prepisa virusne RNA v cDNA.

RT-PCR v realnem času smo izvedli v aparaturi StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). Pri tem smo uporabili komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki vsebuje:

- mešanico dveh encimov, in sicer reverzne transkriptaze (SuperScript™ III Reverse Transcriptase) ter polimeraze DNA (Platinum® *Taq* DNA polymerase),
- 2-krat koncentrirana reakcijska mešanica, sestavljena iz pufru z 0,4 mM vsakega dNTP (deoksinukleotid trifosfat) in 6 mM MgSO<sub>4</sub>,
- MgSO<sub>4</sub> v koncentraciji 50 mM,
- barvilo ROX v koncentraciji 25 μM.

Barvilo ROX deluje kot notranje referenčno barvilo in zmanjša vpliv nespecifične fluorescence v posameznih vzorcih (Di Trani in sod., 2006).

Vse izbrane vzorce smo z reakcijo RT-PCR v realnem času testirali na prisotnost virusa influence tipa A. Posamezne stopnje priprave reakcijske mešanice smo opravljali v komorah za varno delo in pri tem uporabljali ustrezna zaščitna sredstva. Rokavice smo večkrat zamenjali in pazili, da ni prišlo do kontaminacije reakcijske mešanice.

Volumen reakcijske mešanice je bil 25  $\mu\text{l}$  in je vseboval naslednje sestavine:

- 0,15  $\mu\text{l}$  začetnega oligonukleotida FluF A1 (25  $\mu\text{l}$ ),
- 0,15  $\mu\text{l}$  začetnega oligonukleotida FluF A2 (25  $\mu\text{l}$ ),
- 0,25  $\mu\text{l}$  začetnega oligonukleotida FluR (25  $\mu\text{l}$ ),
- 0,15  $\mu\text{l}$  sonde FluP (25  $\mu\text{l}$ ),
- 1  $\mu\text{l}$   $\text{MgSO}_4$  (50 mM),
- 12,5  $\mu\text{l}$  2-krat koncentrirane reakcijske mešanice,
- 0,5  $\mu\text{l}$  encima SSIII RT/Platinum Taq Mix,
- 0,5  $\mu\text{l}$  barvila ROX,
- 4,8  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O (deionizirana in sterilizirana voda),
- 5  $\mu\text{l}$  RNA.

Obratni prepis virusne RNA v cDNA je potekal 15 minut pri temperaturi 50 °C. Temu je sledila prekinitve delovanja reverzne transkriptaze SuperScript<sup>TM</sup> III in aktivacija encima polimeraze Platinum<sup>®</sup> Taq DNA, in sicer 2 minuti pri temperaturi 95 °C. Nato je sledilo 45 temperaturnih ciklov reakcije PCR:

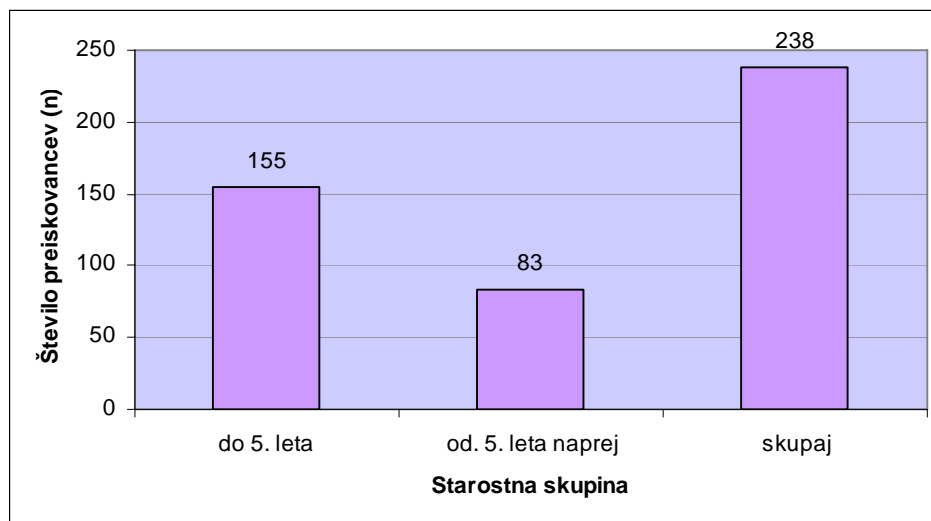
- denaturacija dvovijačne cDNA: 15 sekund, pri 95 °C
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov in sonde ter podaljševanje verige: 45 sekund, pri 60 °C.

Po končani reakciji RT-PCR smo rezultate analizirali na računalniku, kjer se nam je izrisala krivulja pomnoževanja. Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linijo praga fluorescence, katero smo sami določili. Izpisali smo njihove vrednosti Ct.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili skupno 238 kliničnih vzorcev. Od teh je 132 (55,5 %) vzorcev pripadalo osebam moškega spola in 106 (44,4 %) vzorcev osebam ženskega spola. Preiskovance smo razdelili v dve starostni skupini. V starostno skupino predšolskih otrok, v katero smo razvrstili otroke do 5. leta starosti, smo vključili 155 (65,1 %) vzorcev. V starostno skupino od 5. leta starosti naprej pa 83 (34,9 %) vzorcev (slika 12). Najmlajši preiskovanec je bil star manj kot mesec dni, najstarejši je bil star 88 let, največ preiskovancev je bilo starih 1 leto ali manj.



**Slika 12:** Število preiskovancev v posamezni starostni skupini, katerih vzorce smo prejeli v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij, v januarju in februarju 2008 in jih testirali na prisotnost virusa INF A.

V diplomski nalogi smo uporabili vzorce iz kužnin dihal (preglednica 1).

**Preglednica 1:** Klinični vzorci iz kužnin dihal, ki so bili vključeni v raziskavo.

Vzorci	Število vzorcev	Delež (%)
<b>Bris nosnožrelne sluznice</b>	132	55,5
<b>Bris žrela</b>	85	35,7
<b>Aspirat traheje</b>	15	6,3
<b>Bronhoalveolarni izpirek</b>	5	2,1
<b>Bris nosu</b>	1	0,4

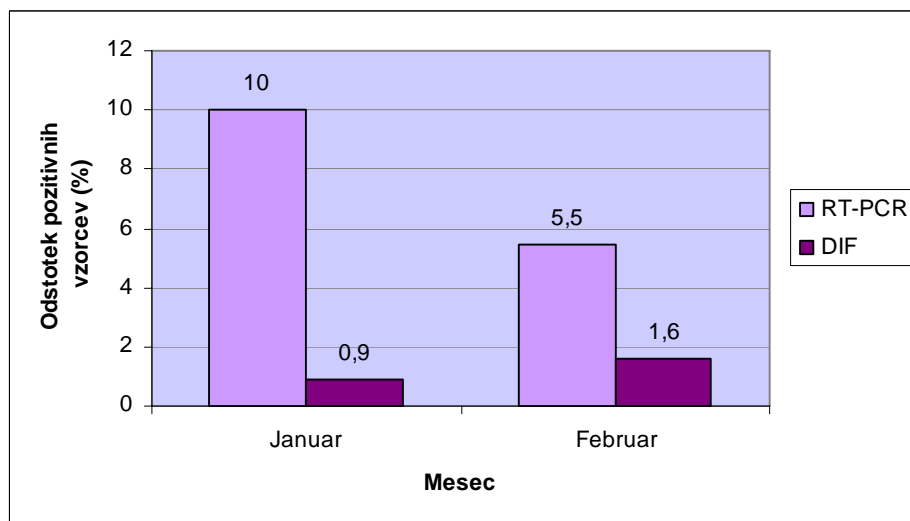
Pregledani vzorci so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij v mesecu januarju in februarju leta 2008 (preglednica 2).

**Preglednica 2:** Število pregledanih kliničnih vzorcev v mesecu januarju in februarju leta 2008.

Mesec	Število vzorcev
Januar	110
Februar	128
Skupaj	238

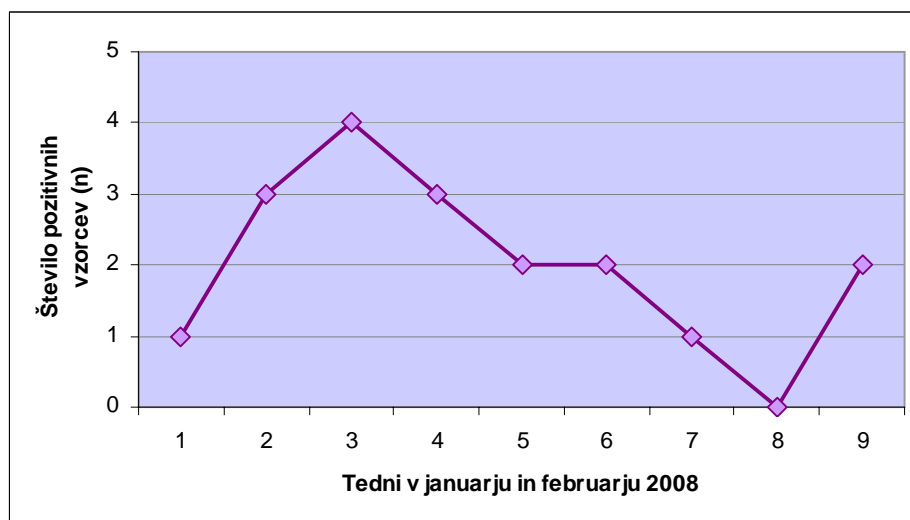
#### 4.2 REZULTATI METODE RT-PCR V REALNEM ČASU

Z metodo RT-PCR v realnem času smo v vseh izbranih vzorcih dokazovali virus influence A. Virusno RNA smo dokazali v 18 (7,6 %) od 238 pregledanih vzorcev. Od tega je bilo 11 pozitivnih vzorcev januarja in 7 pozitivnih vzorcev v mesecu februarju (slika 13).



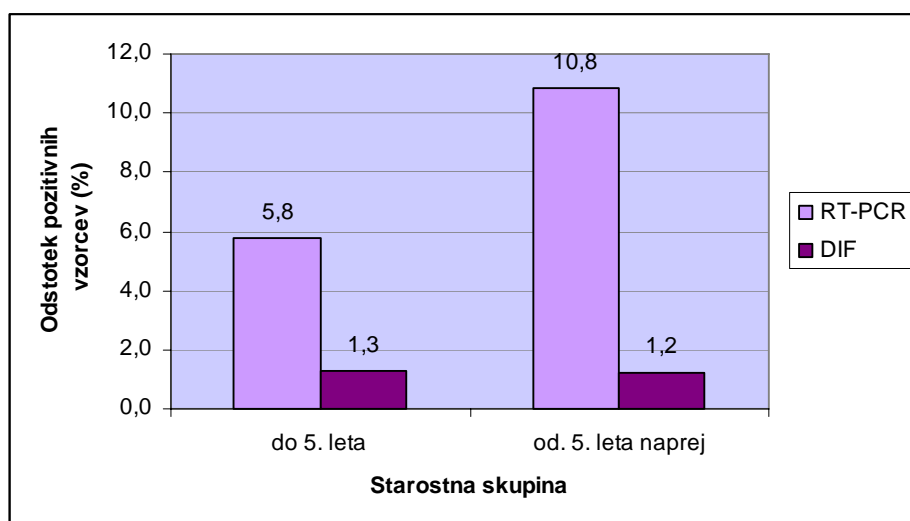
**Slika 13:** Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa INF A v januarju in februarju leta 2008, dokazanih z metodo RT-PCR v realnem času in metodo DIF.

Največ vzorcev, v katerih smo dokazali nukleinsko kislino virusa influence A, je bilo poslanih med 2. in 4. tednom leta 2008 (slika 14).



**Slika 14:** Število pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa INF A v posameznem tednu januarja in februarja leta 2008.

Število pozitivnih vzorcev je bilo enako v obeh starostnih skupinah. Delež okuženih je bil večji v skupini preiskovancev, ki so bili stari več kot pet let. V tej skupini smo okužbo z virusom influence A dokazali v 9 (10,8 %) od 83 testiranih vzorcev. V starostni skupini predšolskih otrok smo prisotnost virusne RNA dokazali v 9 (5,8 %) od 155 pregledanih vzorcev (slika 15).



**Slika 15:** Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa INF A v posamezni starostni skupini, dokazanih z metodo RT-PCR v realnem času in metodo DIF.



Izmed 106 vzorcev žensk, je bilo pozitivnih 10 (9,4 %). Delež pozitivnih vzorcev oseb moškega spola je bil nižji, in sicer smo virusno RNA dokazali v 8 (6,1 %) od 132 vzorcev.

Izmed skupno 18 pozitivnih vzorcev je bilo največ brisov žrela, in sicer 9 (50,0 %), sledilo je 7 (38,9 %) brisov nosnožrelne sluznice ter 2 (11,1 %) bronhoalveolarna izpirka.

#### 4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV METODE RT-PCR V REALNEM ČASU Z REZULTATI METODE DIF

V redni diagnostiki virusnih okužb dihal so z metodo DIF pregledali 236 vzorcev. Od skupno 238 vzorcev, ki smo jih testirali z metodo RT-PCR v realnem času, 2 (0,8 %) z metodo DIF nista bila analizirana. Okužbo z virusom influence A so dokazali v 3 (1,3 %) vzorcih. Pri vseh treh preiskovancih smo okužbo potrdili tudi z RT-PCR. Noben vzorec, v katerem smo dokazali virusno nukleinsko kislino, ni bil med tistimi vzorci, ki jih v redni diagnostiki niso pregledali (preglednica 3). Samo z metodo RT-PCR smo virus influence A dokazali v 15 (83,3 %) od skupno 18 pozitivnih vzorcev. To pomeni, da smo virus dokazali v 66,6 % več vzorcev, kot z metodo DIF. Ujemanje rezultatov obeh diagnostičnih metod, če primerjamo le tiste vzorce, ki so bili analizirani z obema diagnostičnima metodama, je 93,6 %.

**Preglednica 3:** Rezultati testiranja vzorcev na okužbo z virusom INF A, z metodo DIF in RT-PCR. Okrajšave: NT-ni testirano.

Rezultati RT-PCR	Starost	Rezultati DIF				NT	Skupaj
		Pozitivni		Negativni			
		Do 5. leta	Od 5. leta	Do 5. leta	Od 5. leta		
Pozitivni	Do 5. leta	2	-	7	-	0	18
	Od 5. leta	-	1	-	8		
Negativni	Do 5. leta	0	-	145	-	2	220
	Od 5. leta	-	0	-	73		
<b>Skupaj</b>		3		233		2	238

V Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij so januarja 2008, z metodo DIF, dokazali 1 pozitiven vzorec ali 0,9 % od 110 pregledanih vzorcev, februarja pa 2 ali 1,6 % od 126 pregledanih vzorcev (slika 13).

V rutinski diagnostiki so, pri otrocih do 5. leta starosti, virus influence A dokazali v 2 (1,3 %) od skupno 154 vzorcev. Pri preiskovancih starih več kot pet let, so virus določili le v 1 (1,2 %) od 82 vzorcev (slika 15).

V redni diagnostiki so pregledali 131 vzorcev oseb moškega spola, med katerimi sta bila 2 (1,5 %) pozitivna. Izmed 105 preiskanih vzorcev oseb ženskega spola so okužbo določili le v 1 vzorcu (1,0 %).

Med tremi pozitivnimi vzorci sta bila 2 brisa žrela in 1 bris nosnožrelne sluznice.

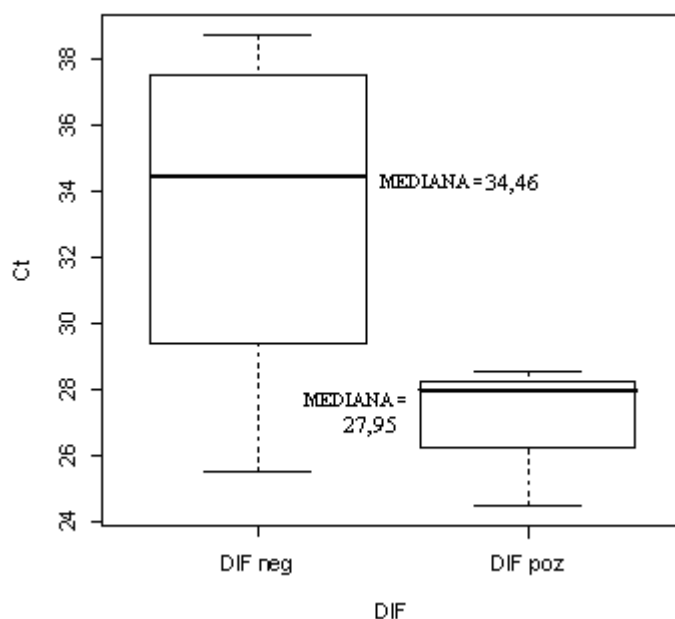
#### 4.3.1 Vrednosti Ct

Z metodo RT-PCR smo za vsak vzorec, v katerem se je tarčna RNA virusa influence A uspešno pomnožila, določili vrednost Ct. V preglednici 4 so za primerjavo podani tudi rezultati rutinskega testiranja z metodo direktne imunofluorescence.

**Preglednica 4:** Pozitivni rezultati testiranja vzorcev z metodo RT-PCR v realnem času in vrednosti Ct. Okrajšave: bris NF-bris nosnožrelne sluznice; NEG-negativno; POZ-pozitivno; INF A- virus influence A.

Spol	Starost	Vzorec	DIF	RT-PCR	Ct
Ž	3 leta	bris NF	NEG	POZ INF A	32,85
Ž	16 let	bris žrela	NEG	POZ INF A	37,73
M	4 leta	bris žrela	NEG	POZ INF A	37,28
M	3 leta	bris žrela	POZ INF A	POZ INF A	28,50
Ž	6 let	bris žrela	NEG	POZ INF A	34,46
M	24 mesecev	bris NF	NEG	POZ INF A	28,68
M	6 let	BAL	NEG	POZ INF A	27,69
M	7 let	bris NF	NEG	POZ INF A	35,99
Ž	6 let	bris NF	NEG	POZ INF A	38,22
Ž	35 mesecev	bris NF	NEG	POZ INF A	35,44
M	11 mesecev	bris NF	POZ INF A	POZ INF A	27,95
M	4 leta	bris žrela	NEG	POZ INF A	27,72
Ž	5 let	bris žrela	NEG	POZ INF A	38,76
Ž	28 mesecev	bris NF	NEG	POZ INF A	38,57
Ž	42 let	BAL	NEG	POZ INF A	32,56
M	41 let	bris žrela	NEG	POZ INF A	25,47
Ž	34 let	bris žrela	POZ INF A	POZ INF A	24,43
Ž	41 let	bris žrela	NEG	POZ INF A	30,06

Slika 16 prikazuje okvir z ročaji za vrednosti Ct glede na rezultate rutinskega testiranja z metodo DIF. Pri treh pozitivnih vzorcih, ki so bili dokazani z metodo RT-PCR in DIF, so bile vrednosti Ct večinoma nižje od vrednosti Ct petnajstih pozitivnih vzorcev, ki smo jih dokazali samo z metodo RT-PCR. Mediana za vrednosti Ct pozitivnih vzorcev, ki so bili dokazani z obema metodama je bila 27,95. Mediana za vrednosti Ct pozitivnih vzorcev, ki smo jih dokazali samo z metodo RT-PCR je znašala 34,46. 75 % vzorcev, ki so bili v redni diagnostiki lažno negativni, je imelo vrednosti Ct višje od 29,37, medtem ko je imelo 75 % vzorcev, pri katerih je bila okužba potrjena že v redni diagnostiki, vrednosti Ct nižje od 28,23. Najvišja vrednost Ct med vzorci, ki so bili pri testiranju z metodo DIF negativni, je bila 38,76. Najnižja vrednost Ct med temi vzorci je bila 25,47. Med vzorci, pri katerih smo okužbo z virusom influence A potrdili z obema metodama, je bila najvišja vrednost Ct 28,50, medtem ko je bila najnižja vrednost Ct 24,43.



**Slika 16:** Okvir z ročaji za vrednosti Ct glede na rezultate metode DIF. Podatki so za 15 pozitivnih vzorcev, ki smo jih dokazali z metodo RT-PCR in jih v redni diagnostiki z metodo DIF niso določili (DIF neg) ter za 3 vzorce, ki so bili dokazani z metodama RT-PCR in DIF (DIF poz). Slika prikazuje največjo in najmanjšo vrednost Ct, kvartile ter mediano za posamezno skupino vzorcev.

Na podlagi slike sklepamo, da je bilo v vzorcih, ki smo jih dokazali samo z metodo RT-PCR, večinoma manj virusne RNA, kot v vzorcih, ki smo jih dokazali z obema diagnostičnima metodama. Rezultati metode DIF so odvisni od količine virusov v vzorcu.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Virusi influence A so pogost vzrok okužb dihal po vsem svetu. Za gripo zbolijo ljudje vseh starostnih skupin, najbolj nevarna pa je za majhne otroke, starostnike in imunsko oslABLJENE (Habib-Bein in sod., 2003). Za zdravljenje gripe obstajajo protivirusna zdravila, katerih učinkovitost je pogojena s pričetkom zdravljenja. Prav zaradi tega je ustrezna in hitra diagnostika ključnega pomena (Carraro in sod., 2007).

Klasične diagnostične metode, kot so osamitev virusa v celični kulturi in serološke metode, so zamudne. Rezultate nam podajo v 3 do 6 dneh, kar onemogoča učinkovito zdravljenje (Daum in sod., 2007). Najpogostejša metoda, ki se jo uporablja v rutinski diagnostiki okužb z virusi influence A ter drugimi respiratornimi virusi, je metoda direktne imunofluorescence. Metoda je hitra in specifična, vendar je njena občutljivost odvisna od kakovosti vzorca in izkušenosti laboratorijskega osebja (Habib-Bein in sod., 2003).

Številne raziskave kažejo na to, da je dokazovanje virusne nukleinske kisline z RT-PCR, trenutno najbolj specifična in občutljiva diagnostična metoda. Rezultati so na voljo v 4 do 6 urah po sprejemu vzorca v laboratorij (van Elden in sod., 2001; Habib-Bein in sod., 2003; Mahlmann in sod., 2007). Kvaliteta vzorca in ustreznost prenosa vzorca imata na občutljivost RT-PCR manjši vpliv, kot pri metodi DIF. Metoda omogoča tudi razlikovanje med tipi in podtipi virusa influence, kar je še posebej pomembno za spremljanje kroženja virusov influence med ljudmi in živalmi (Harper in sod., 2009).

Z našo diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti ali je metoda RT-PCR v realnem času bolj občutljiva od metode DIF, ki jo v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij uporabljajo pri vsakodnevni diagnostiki virusnih povzročiteljev okužb dihal.

V diplomski nalogi smo v kliničnih vzorcih dokazovali RNA virusa influence A. Virusno nukleinsko kislino smo dokazovali na podlagi pomnoževanja odseka gena za matrično beljakovino. Pri tem smo uporabili začetne oligonukleotide, sondo ter podobne pogoje

pomnoževanja, kot so bili opisani v članku, ki je bil objavljen v reviji *Journal of Clinical Microbiology* leta 2006.

Pri naši raziskavi smo z metodo RT-PCR v realnem času, virus influence A dokazali v 7,6 % pregledanih vzorcev. Od tega je 10 % pozitivnih vzorcev prispelo v laboratorij januarja in 5,5 % februarja leta 2008. To kaže na večjo aktivnost virusa v mesecu januarju. Iz slike 14 je razvidno, da smo največ pozitivnih vzorcev v laboratorij dobili med 2. in 4. tednom leta 2008. To je skladno z ugotovitvami, ki so bile predstavljene v letnem poročilu o epidemiološkem spremljanju nalezljivih bolezni v letu 2007, ki ga je pripravil IVZ (Kraigher in sod., 2008).

V raziskavi smo med seboj primerjali dve starostni skupini. Pričakovali smo, da bomo večjo število pozitivnih vzorcev našli v skupini predšolskih otrok, v katero smo uvrstili 65,1 % vseh vzorcev. Kužnine dihal majhnih otrok, v katerih iščemo povzročitelje okužb dihal so v redni diagnostiki eni najpogostejših vzorcev. Število pozitivnih vzorcev je bilo v obeh starostnih skupinah enako. Delež pozitivnih vzorcev je bil večji v skupini preiskovancev, ki so bili stari več kot pet let. RNA virusa influence A smo dokazali pri 10,8 % preiskovancev. Pri tem moramo upoštevati, da je bila ta skupina bistveno manjša od skupine predšolskih otrok, v kateri smo okužbo potrdili pri 5,8 % otrok. Če analiziramo vse pozitivne vzorce lahko opazimo, da smo na splošno največ okužb z virusom gripe dokazali pri otrocih med 2. in 7. letom starosti in bistveno manj pri odraslih preiskovancih. Obolevnost za gripo je največja ravno med otroci. Vzorci odraslih oseb so v redni diagnostiki okužb z virusi influence bistveno redkejši. Odrasli lažje prebolevalo gripo in večinoma ne potrebujejo bolnišničnega zdravljenja.

Pri preiskovankah smo ugotovili nekoliko več pozitivnih vzorcev kot pri preiskovancih, kljub temu, da je bilo število vzorcev žensk manjše.

Vrsta in kakovost vzorca sta pomembna dejavnika, ki vplivata na občutljivost diagnostične metode. Nekateri avtorji predlagajo, da so najboljši vzorci za ugotavljanje okužb z virusi influence pri novorojenčkih in majhnih otrocih nosni brisi, medtem ko so pri večjih otrocih in odraslih to brisi nosnožrelne sluznice. Pri imunsko oslabeledih ljudeh priporočajo

bronhoalveolarne izpirke in druge vrste vzorcev spodnjih dihal (Harper in sod., 2009). V naši raziskavi je bilo največ pozitivnih vzorcev med brisi žrela in nosnožrelne sluznice, ki so bili tudi sicer najpogostejša vrsta vzorcev.

Rezultate testiranja vzorcev z RT-PCR v realnem času smo primerjali z rezultati rutinskega testiranja vzorcev z metodo direktne imunofluorescence. S slednjo je bilo analiziranih 99,2 % vseh vzorcev vključenih v našo raziskavo. Virus influence A so dokazali le v 1,3 % vzorcev, kar je bistveno manj, kot smo jih dokazali z metodo RT-PCR. S tem smo potrdili našo hipotezo, da je metoda RT-PCR občutljivejša od metode DIF. Vsi pozitivni vzorci, ki smo jih dokazali z RT-PCR, so bili testirani tudi z metodo DIF. Od 18 vzorcev, v katerih smo dokazali nukleinsko kislino virusa influence A, je bilo med njimi le 16,7 % takih, ki so bili pozitivni tudi z metodo DIF. Noben izmed pozitivnih vzorcev ni bil določen le z metodo direktne imunofluorescence. Samo z RT-PCR smo odkrili 83,3 % od 18 pozitivnih vzorcev. To je 66,6 % več pozitivnih vzorcev v primerjavi z metodo DIF. Ujemanje med rezultati obeh metod, če upoštevamo le vzorce, ki smo jih testirali z obema metodama, je bilo 93,6 %. Pri interpretaciji ujemanja moramo upoštevati, da smo pri testiranju vzorcev dobili veliko število negativnih rezultatov, ki so prispevali k visokemu odstotku ujemanja. S primerjavo le pozitivnih vzorcev je razlika v neujemanju rezultatov obeh diagnostičnih metod veliko bolj očitna. V rutinski diagnostiki so z metodo DIF določili 15 lažno negativnih vzorcev.

Med rutinsko diagnostiko je bila dokazana večja prekuženost preiskovancev z virusom influence v mesecu februarju 2008, kar se razlikuje od naših ugotovitev. Glede na majhno število pozitivnih vzorcev, se delež pozitivnih vzorcev med starostnima skupinama ni bistveno razlikoval. Ob primerjavi rezultatov obeh metod lahko ugotovimo razlike v porazdelitvi odstotkov pozitivnih vzorcev med moškimi in ženskami ter porazdelitvi odstotkov pozitivnih vzorcev v posameznem mesecu.

V ameriški raziskavi, ki so jo leta 2006 izvedli Kuypers in sodelavci, so v vzorcih, ki so bili pozitivni na respiratorne viruse z metodo DIF in RT-PCR, dokazali večje število kopij virusne nukleinske kisline v ml vzorca. Samo z metodo RT-PCR določeni pozitivni vzorci so imeli večinoma trikrat manjšo vsebnost kopij v ml vzorca. V tej diplomski nalogi nismo

ugotavljali natančne količine virusne RNA, kljub temu pa smo želeli s pomočjo vrednosti Ct oceniti, ali ugotovitve ameriških raziskovalcev držijo tudi za naše vzorce. Visoka vrednost Ct pomeni nizko začetno količino tarčne nukleinske kisline, ki jo pomnožujemo (Mackay in sod., 2002). Pričakovali smo, da bodo vrednosti Ct vzorcev, ki so bili pozitivni le z RT-PCR višje v primerjavi z vrednostmi vzorcev, ki so bili pozitivni pri testiranju z obema diagnostičnima metodama. Iz slike 16 je razvidno, da smo hipotezo delno potrdili. Polovica vrednosti Ct pozitivnih vzorcev, ki so bili dokazani že v redni diagnostiki z metodo DIF, je bila nižjih od 27,95. Polovica vrednosti Ct vzorcev, ki smo jih dokazali samo z metodo RT-PCR je bila višjih od 34,46. Višje vrednosti Ct nakazujejo na nižjo virusno breme v vzorcih. To je bil vzrok za lažno negativne rezultate, ki so jih dobili pri rutinskem testiranju vzorcev z metodo DIF. S tem smo dodatno potrdili večjo občutljivost molekularne metode.

Pri razlagi vrednosti Ct moramo upoštevati, da je bilo z metodo DIF, dokazanih le 16,7 % od 18 pozitivnih vzorcev, kar je otežilo dokončno potrditev hipoteze. Pri rezultatih je prišlo tudi do odstopanja od postavljene hipoteze. Pri treh vzorcih, kljub nižjim vrednostim Ct (27,69; 27,72; 25,47) in s tem večjo količino virusne RNA v vzorcih, prisotnost virusnih antigenov z metodo DIF ni bila dokazana. Da bi to hipotezo natančneje preverili, bi bilo potrebno v raziskavo vključiti večje število vzorcev in natančno določiti količino virusne nukleinske kisline.

Pri ameriški raziskavi so ugotovili, da je večina pozitivnih vzorcev, ki so jih diagnosticirali z obema metodama, pripadala majhnim otrokom in so vsebovali večjo količino virusne nukleinske kisline. Pozitivni vzorci, ki so jih dokazali le z RT-PCR, pa so večinoma pripadali starejšim otrokom in so vsebovali manj virusne nukleinske kisline (Kuypers in sod., 2006). Povprečna starost preiskovancev, ki smo jim diagnosticirali okužbo z virusom influence A z obema metodama in povprečna starost preiskovancev, katerih vzorci so bili pozitivni le z metodo RT-PCR, se pri naši raziskavi ni bistveno razlikovala.

S pregledom rezultatov metode direktne imunofluorescence, s katero v laboratoriju redno določajo še šest respiratornih virusov in rezultatov metode RT-PCR, morebitnih sočasnih okužb z drugimi respiratornimi virusi nismo odkrili.

Pri našem delu smo uporabljali pozitivno in negativno kontrolo pomnoževanja. Lažno negativni rezultati lahko nastanejo kot posledica zaviralcev reakcije, nizke začetne količine virusov v vzorcu, razgradnje RNA, slabe izolacije virusne nukleinske kisline, razgradnje reagentov ali drugih napak izvajalca dela (Daum in sod., 2007). Pomanjkljivost našega dela je bila, da pri izolaciji nukleinske kisline iz vzorcev, kot tudi pri procesu pomnoževanja, nismo uporabili interne kontrole. Z dodatkom interne kontrole v vzorce pred izolacijo nukleinske kisline oziroma pred pomnoževanjem bi lahko nadzorovali uspešnost teh dveh postopkov in se tako izognili lažno negativnim rezultatom (Di Trani in sod., 2006). Iz naših rezultatov ne moremo razbrati koliko lažno negativnih rezultatov smo pri testiranju vzorcev dobili. Verjetnost lažno negativnih rezultatov je ključen problem pri vpeljevanju molekularnih metod v rutinsko diagnostiko (Villanova in sod., 2007).

Na podlagi lepih krivulj pomnoževanja pozitivne kontrole, ki smo jih dobili v posameznih reakcijah PCR, lahko predvidevamo, da smo izbrali ustrezne pogoje pomnoževanja virusne nukleinske kisline in da zaviralcev pomnoževanja v naših vzorcih ni bilo. Iz vzorcev smo izolirali celokupno nukleinsko kislino. Za pomnoževanje virusne RNA smo izbrali zelo specifične začetne oligonukleotide. Z njimi smo pomnoževali zelo ohranjen genski odsek virusa influence A, zato je bila verjetnost lažno pozitivnih vzorcev zelo majhna. Negativna kontrola se v nobeni izmed reakcij PCR ni pomnoževala, zato smo ovrgli morebitno kontaminacijo reakcijskih mešanic. Uporaba enostopenjskega RT-PCR v primerjavi s klasičnim PCR bistveno zmanjšuje možnost kontaminacije.

Z našo diplomsko nalogo smo potrdili dejstvo, da je metoda RT-PCR za dokazovanje virusa influence A specifična in bolj občutljiva od metode direktne imunofluorescence, saj smo z njo dokazali kar 66,7 % več okužb z virusom influence A. Metoda DIF je bila manj občutljiva za obe starostni skupini. RT-PCR v realnem času je poleg tega tudi hitrejša od DIF. Ključna prednost RT-PCR je v analizi rezultatov. Metoda zagotavlja objektivno interpretacijo rezultatov. Njena občutljivost ni odvisna od subjektivne ocene rezultatov laboratorijskega osebja (Kuypers in sod., 2006). Virus influence A lahko v nekaterih primerih povzroči zelo hudo obliko gripe in zaplete. Uporaba diagnostične metode s katero pridobimo rezultate v kratkem času je zato zelo pomembna. Le tako lahko zagotovimo učinkovito zdravljenje bolezni. Poleg tega, metoda RT-PCR omogoča tudi neposredno



določanje virusnega bremena in s tem ugotavljanje učinkovitosti zdravljenja (van Elden in sod., 2001). Ob uporabi ustreznih reagentov, pogojev pomnoževanja, začetnih oligonukleotidov ter sond, lahko v istem vzorcu istočasno določamo različne virusne povzročitelje dihal. Metoda RT-PCR v krajšem času omogoča testiranje bistveno večjega števila vzorcev, kot metoda DIF. To bi imelo še poseben pomen v primeru globalne pandemije (Carraro in sod., 2007)..

Nepričakovane mutacije v genomu virusa influence A lahko privedejo do lažno negativnih rezultatov. Uporaba klasičnih metod, kot je virusna osamitev v celični kulturi, je še vedno zelo pomembna pri prepoznavanju novih virusnih podtipov. Pri analizi rezultatov molekularnih diagnostičnih metod se moramo zavedati, da prisotnost virusne nukleinske kisline v kužnini ne pomeni vedno akutne okužbe.

Virus influence A je en izmed genetsko najbolj spremenljivih virusov kar jih poznamo in predstavlja pravi izziv za oblikovanje molekularnega načina diagnosticiranja (Carraro in sod., 2007). Kljub temu se s pravim pristopom, ustrezno metodologijo dela in laboratorijsko opremo da premostiti tudi te težave. RT-PCR v realnem času predstavlja pomembno alternativo za direktno imunofluorescenco, ki se jo še vedno množično uporablja v redni diagnostiki. Implementacija RT-PCR v redno laboratorijsko diagnostiko bi pomenila korak naprej k zagotavljanju kakovosti rezultatov rutinskega testiranja, vendar moramo pri tem upoštevati tudi vse finančne stroške, ki jih vpeljava metode prinaša s seboj. Uvedba metode v rutinsko diagnostiko manjših laboratorijev je manj primerna predvsem zaradi potrebe po dragi opremi in reagentih. Hitra in ustrezna diagnostika gripe je ključnega pomena pri zagotovitvi ustreznega zdravljenja, zmanjšanja stroškov bolnišničnega zdravljenja in stroškov, ki nastanejo zaradi neustrezne uporabe antibiotikov.

## 5.2 SKLEPI

- Z metodo RT-PCR v realnem času smo virus influence A dokazali v 7,6 % od 238 pregledanih vzorcev, kar je bistveno več kot z metodo DIF. Z metodo direktne imunofluorescence so virus dokazali le v 1,3 % od 236 pregledanih vzorcev.
- Virus influence A smo dokazali pri 5,8 % predšolskih otrok ter pri 10,8 % preiskovancev starih več kot pet let.
- Največ pozitivnih vzorcev je bilo takih, ki so bili v redno diagnostiko poslani januarja. Po podatkih IVZ je bila aktivnost virusa v Sloveniji največja ravno med 2. in 4. tednom leta 2008.
- Sočasnih okužb vzorcev z drugimi respiratornimi virusi, glede na rezultate metode direktne imunofluorescence, nismo odkrili.
- S primerjavo vrednosti Ct smo ugotovili, da so bile pri 75 % vzorcev, ki so bili pozitivni pri testiranju z obema diagnostičnima metodama, vrednosti Ct nižje od 28,23. Pri 75 % vzorcev, ki so bili v redni diagnostiki lažno negativni, pa smo določili vrednosti Ct, ki so bile višje od 29,37. V teh vzorcih je bila količina virusne RNA verjetno nižja kot v pozitivnih vzorcih, ki so jih dokazali že z metodo DIF.
- Metoda RT-PCR v realnem času je bolj specifična in občutljiva od metode DIF. Pomnoževanje in sočasno dokazovanje pridelkov zmanjšuje verjetnost kontaminacij. Specifičnost metode zagotavlja pomnoževanje odseka matričnega gena, ki je zelo ohranjen med sevi virusa influence A.
- Menimo, da je metoda RT-PCR primerna za vpeljavo v rutinsko diagnostiko. Ob tem bi bilo potrebno vključiti tudi primerno interno kontrolo.

## 6 POVZETEK

Gripa je zelo nalezljiva bolezen dihal, ki jo najpogosteje povzročajo virusi influence A. Bolezen večinoma prebolimo brez večjih zapletov. Nevarna je za skupine ljudi z večjim tveganjem za razvoj hude oblike gripe. V teh primerih je ustrezna diagnostika, ki omogoča hitro in učinkovito zdravljenje ključnega pomena.

Z diplomsko nalogo smo želeli preveriti, ali je molekularna metoda RT-PCR bolj občutljiva od metode DIF, ki jo v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij uporabljajo v rutinski diagnostiki virusnih povzročiteljev okužb dihal. Pri tem smo primerjali rezultate testiranja vzorcev dveh starostnih skupin. Virusno nukleinsko kislino smo osamili iz 238 vzorcev, ki so bili kužnine dihal, z avtomatizirano metodo na biorobotu MagNA Pure Compact. Za pomnoževanje virusne RNA smo uporabili RT-PCR v realnem času, ki omogoča hkratno pomnoževanje in dokazovanje pridelkov. Pomnoževali smo del gena M, ki je med različnimi sevi virusa influence A zelo ohranjen. Za dokaz pridelkov smo uporabili sondo MGB, ki ima vrsto prednosti pred običajnimi sondami. Virus influence A smo dokazali v 7,6 % pregledanih vzorcev. Pri rednem testiranju vzorcev z metodo DIF, so virus dokazali le v 1,3 % vzorcev. Pri starostni skupini ljudi starih več kot 5 let, smo okužbo dokazali pri 10,8 % ter v skupini predšolskih otrok pri 5,8 %. Največji delež pozitivnih vzorcev smo dokazali v mesecu januarju 2008. Po podatkih IVZ je bila v tem mesecu največja aktivnost virusa influence A v Sloveniji. Z metodo RT-PCR smo dokazali 66,6 % več pozitivnih vzorcev in pri tem potrdili vse pozitivne vzorce, ki so jih v redni diagnostiki dokazali z metodo DIF. Iz rezultatov je razvidno tudi, da je večina pozitivnih vzorcev, ki smo jih določili le z RT-PCR vsebovala manj virusne RNA. To kaže na večjo občutljivost metode RT-PCR, ki omogoča dokaz okužbe, kljub manjši količini virusov v preiskovanih vzorcih.

Iz rezultatov naše raziskave lahko sklepamo, da je metoda RT-PCR primerna za vpeljavo v redno diagnostiko okužb z virusom influence A. Metoda je hitra, specifična, občutljiva ter omogoča istočasno dokazovanje virusa v večjem številu vzorcev, kot metoda DIF. S primerno optimizacijo pogojev, ustreznimi reagenti, začetnimi oligonukleotidi in sondami bi omogočila istočasno dokazovanje različnih respiratornih virusov v enem vzorcu.

## 7 VIRI

- Abdel-Ghafar A-N., Chotpitayasunondh T., Gao Z., Hayden F.G., Duc Hien N., de Jong M.D., Naghdaliyev A., Peiris M., Shindo N., Soeroro S., Uyeki T.M. 2008. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *New England Journal of Medicine*, 358, 3: 261-273
- Berensmeier S. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 495-504
- Bouvier N.M., Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26: 49-53
- Bustin S., Mueller R. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109: 365-379
- Carraro E., Ferreira Neto D., Benfica D., SittaPerosa A.H., Hernandes Granato C.F., Junqueira Bellei N.C. 2007. Applications of duplex reverse transcription polymerase chain reaction and direct immunofluorescence assay in comparison with virus isolation for detection of influenza A and B. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57: 53-57
- Couceiro J.N., Paulson J.C., Baum L.G. 1993. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium: the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research*, 29, 2: 155-165
- Cox N.J., Subbarao K. 1999. Influenza. *Lancet*, 354: 1277-1282
- Daum L.T., Canas L.C., Arulanandam B.P., Niemeyer D., Valdes J.J., Chambers J.P. 2007. Real-time RT-PCR assay for type and subtype detection of influenza A and B viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 1: 167-175

- Di Trani L., Bedini B., Donatelli I., Campitelli L., Chiappini B., De Marco M. A., Delogu M., Buonavoglia C., Vaccari G. 2006. A sensitive one-step real time PCR for detection of avian influenza viruses using MGB probe and an internal positive control. *Infectious Diseases*, 6, 87: [1-8]
- Dolenc J. 2005. Gripa razsaja! Vse kar ste hoteli vedeti o gripi. *Spatula*, 34: 4-7
- Dwyer D.E., Smith D.W., Catton M.G., Barr I.G. 2006. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. *Medical Journal of Australia*, 185, 10: 48-53
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao 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, 1: 165-256
- Gallaher W.R. 2009. Towards a sane and rational approach to management of influenza H1N1 2009. *Virology Journal*, 51, 6: 1-20
- Garcia-Garcia J., Ramos C. 2006. La influenza, un problema vigente de salud publica. *Salud Publica de Mexico*, 48, 3: 244-267
- Gavin P.J., Thomson R.B. Jr. 2003. Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4: 151-172
- Gillim-Ross L., Subbarao K. 2006. Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 614-36
- Gurtler L. 2006. Virology of human influenza. V: *Influenza report 2006*. Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. (eds.). Paris, Flying Publisher: 87-91  
<http://www.influenzareport.com> (2. feb. 2009): 87-91

- Habib-Bein N.F., Beckwith W.H., Mayo D., Landry M.L. 2003. Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct immunofluorescence and cell culture assays in a medical center for detection of influenza A virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8: 3597-3601
- Harper S.A., Bradley J.S., Englund J.A., File T.M., Gravenstein S., Hayden F.G., McGeer A.J., Neuzil K.M., Pavia A.T., Tapper M.L., Uyeki T.M., Zimmerman R.K. 2009. Seasonal influenza in adults and children – diagnosis, treatment, chemoprophylaxis and institutional outbreak management: Clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48: 1003-1032
- Hoffmann C., Kamps B.S. 2006. Clinical presentation. V: *Influenza report 2006*. Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. (eds.). Paris, Flying Publisher: 160-169  
<http://www.influenzareport.com> (2. feb. 2009): 160-169
- Hoffmann C., Korsman S., Kamps B.S. 2006. Treatment and prophylaxis. V: *Influenza report 2006*. Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. (eds.). Paris, Flying Publisher: 170-187  
<http://www.influenzareport.com> (2. feb. 2009): 170-187
- Kahn J.S. 2006. Epidemiology of human Metapneumovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 546-557
- Kamps B.S., Reyes-Terán G. 2006. Influenza 2006. V: *Influenza report 2006*. Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. (eds.). Paris, Flying Publisher: 17-47  
<http://www.influenzareport.com> (2. feb. 2009): 17-47
- Karp G. 2008. *Cell and molecular biology*. 5<sup>th</sup> ed. New York, John Wiley & Sons: 776 str.
- Kilbourne E.D. 2006. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1: 9-14

- Kirchgesser M., Schlangenhauer R., Kirchner B., Adem C., Malmberg W., Tgetgel A., Huber I., Nieswandt V., Walter T. 2003. The new MagNA pure compact nucleic acids isolation kits - fast and flexible fully automated sample preparation. *Biochemica*, 4: 12-14
- Koren S. 2005. Virusna cepiva in imunski serumi. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 155-169
- Koren S., Avšič-Županc T. 2005. Virusna genetika in izvor virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 37-47
- Kraigher A., Grilc E., Blaško M., Praprotnik M., Klavs I., Kastelic Z., Kustec T., Bergant N., Grič Vitek M., Učakar V., Sočan M., Paragi M., Prosenc K., Berginc N., Šubej V., Koren N., Pokrajc T. 2008. Gripa in druge akutne okužbe dihal v sezoni 2007/2008. V: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2007. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 23-29  
<http://www.ivz.si/ivz/> (17. dec. 2008): 23-29
- Kuszewski K., Brydak L. 2000. The epidemiology and history of influenza. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 54: 188-195
- Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempcy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28, 2: 655-661
- Kuypers J., Wright N., Ferrenberg J., Huang M., Cent A., Corey L., Morrow R. 2006. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 7: 2382-2388

- Leland D.S. 1996. Viral antigen detection. V: Clinical virology. 1<sup>th</sup> ed. Leland D.S. (ed.). Philadelphia, W. B. Saunders Company: 91-100
- Lipatov A.S., Govorkova E.A., Webby R.J., Ozaki H., Peiris M., Guan Y., Poon L., Webster R.G. 2004. Influenza: emergence and control. *Journal of Virology*, 78, 17: 8951-8959
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190-212
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6: 1292-1305
- Mahlmann M., Bonner A.B., Williams J.V., Dankbar D.M., Moore C.L., Kuchta R.D., Podsiad A.B., Tamerius J.D., Dawson E.D., Rowlen K.L. 2007. Comparison of the MChip to viral culture, reverse transcription-PCR, and the QuickVue influenza A+B test for rapid diagnosis of influenza. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 4: 1234-1237
- Manojkumar R., Mrudula V. 2006. Applications of real-time reverse transcription polymerase chain reaction in clinical virology laboratories for diagnosis of human disease. *American Journal of Infectious Diseases*, 2, 4: 204-209
- Marin J. 2005. Neposredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 109-118
- Marolt-Gomišček M. 2002. Influenca – gripa. V: Infekcijske bolezni. 2. izd. Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 381-386
- Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D. 2004. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology*, 78, 22: 12665-12667



- Memoli M.J., Morens D.M., Taubenberger J.K. 2008. Pandemic and seasonal influenza: therapeutic challenges. *Drug Discovery Today*, 13, 13/14: 590-595
- Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije. 2008. Nacionalni plan pripravljenosti v primeru pandemije gripe. Epidemiološko in virološko spremljanje gripe. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije  
[http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz\\_dokumenti/vprasanja\\_in\\_odgovori/pticja\\_gripa/...plan/pp\\_Priloga\\_2.doc](http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz_dokumenti/vprasanja_in_odgovori/pticja_gripa/...plan/pp_Priloga_2.doc) (17. dec. 2008): 4 str.
- Monto A.S. 2008. Epidemiolog of influenza. *Vaccine*, 26: 45-48
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2005. *Medical microbiology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Elsevier Mosby: 963 str.
- Nicholson K.G., Wood J.M., Zambon M. 2003. Influenza. *Lancet*, 362: 1733-1745
- Palese P., Shaw M.L. 2007. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. V: *Fields virology*. 5<sup>th</sup> ed. Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). Philadelphia, Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins: 1647-1690
- Peiris M.J.S., D. de Jong M., Guan Y. 2007. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 2: 243-267
- Petric M., Comanor L., Petti C.A. 2006. Role of laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *Journal of Infectious Disease*, 194: 98-110
- Potter C.W. 2004. Influenza. V: *Principles and practice of clinical virology*. 5<sup>th</sup> ed. Zuckerman A.J. (ed.). Chichester, Wiley: 271-297
- Rothberg M.B., Haessler S.D., Brown R.B. 2008. Complications of viral influenza. *American Journal of Medicine*, 121, 4: 258-264

- Sandrock C., Kelly T. 2007. Clinical review: update of avian influenza a infections in humans. *Critical Care*, 11, 2: [1-9]
- Simonsen L. 1999. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine*, 17: 3-10
- Sporočilo za javnost. Ptičja gripa v Sloveniji. 2006. Ljubljana, Urad vlade Republike Slovenije za informiranje (16. feb. 2006)  
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=495> (25. feb. 2008): 1-1
- Todar K. 2007. The microbial world: animal viruses. Madison, University of Wisconsin  
<http://www.bioinfo.bact.wisc.edu/.../AnimalViruses.html> (15. maj. 2009): 1-1
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159
- van Elden L.J.R., Nijhuis M., Schipper P., Schuurman R., van Loon A.M. 2001. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1: 196-200
- Villanova G.V., Gardiol D., Taborda M.A., Reggiardo V., Tanno H., Rivadeneira E.D., Perez G.R., Giri A.A. 2007. Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 11: 3555-3563
- Vse o gripi. 2007. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (19. jan. 2007)  
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=572> (20. feb. 2009): 1-1
- Waltenberger H., Ziesemer M., Deucker A. 2004. MagNA pure compact system – results of a performance study for viral nucleic acid isolation from serum and plasma samples. *Biochemica*, 3: 10-11

- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56, 1: 152-179
- Weissbrich B., Neske F., Schubert J., Tollmann F., Blarh K., Blessing K., Kreth H. W. 2006. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *Infectious Diseases*, 6, 109: [1-7]
- Werner O., Harder T.C. 2006. Avian influenza. V: *Influenza report 2006*. Kamps B.S., Hoffmann C., Preiser W. (eds.). Paris, Flying Publisher: 48-86  
<http://www.influenzareport.com> (2. feb. 2009): 48-86
- What is real time PCR. 2009. Real time PCR research. Montreal, ICMG-ion channel media group  
<http://www.rt-pcr.com> (4. maj. 2009): 1-1
- WHO. 2009. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. Geneva, World Health Organization (2. mar. 2009)  
[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2009\\_03\\_02/en/print.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_03_02/en/print.html) (2. mar. 2009): 1-1
- Wong S.Y., Yuen K. 2006. Avian influenza infections in humans. *Chest*, 129: 156-168
- Yeldandi A.V., Colby T.V. 1994. Pathologic features of lung biopsy specimens from influenza pneumonia cases. *Human Pathology*, 25: 47-53
- Zakon o nalezljivih boleznih (uradno prečiščeno besedilo) (ZNB-UPB1). 2006. Ljubljana, Uradni list Republike Slovenije, 16, 33: 3488-3497
- Zebedee S.L., Lamb R.A. 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of Virology*, 62, 8: 2762-2772

## **ZAHVALA**

Najprej bi se iskreno zahvalila mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, ker mi je omogočil opravljanje diplome na področju, ki me že od nekdaj veseli. Zahvalila bi se mu za ves dragocen čas, ki mi ga je namenil, za vse koristne nasvete, pomoč in spodbudo pri nastajanju diplome.

Zahvaljujem se prof. dr. Tatjani Avšič Županc za hitro in konstruktivno recenzijo diplomske naloge.

Za prijetno in toplo vzdušje pri opravljanju praktičnega dela, bi se rada zahvalila vsej strokovni ekipi iz Laboratorija za diagnostiko virusnih infekcij, še posebno pa Moniki, ki me je tekom dela usmerjala, mi pomagala in veliko tudi naučila.

Najlepša hvala Dariji Mežnar Steklasa za lektoriranje diplomske naloge.

Zahvala gre tudi Janji, Ksenji, Tadeji, Vesni, Kaji, Petri in ostalim sošolkam in sošolcem, ki so polepšali moje študijske dni.

Posebna zahvala gre mojemu Tomažu, ki je z menoj preživel vse vesele, pa tudi težke trenutke, me ves čas študija spodbujal in verjel vame.

Iz srca se zahvaljujem moji družini, brez katere me tu kjer sem sedaj, ne bi bilo. Zahvalila bi se jim za vso podporo in spodbudne besede pri nastajanju diplome. Hvala vam, ker mi vedno stojite ob strani.

Najlepša hvala vsem!

## PRILOGA

**Priloga A1:** Seznam 238 vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času in rezultati rutinskega testiranja z DIF. Okrajšave: MPV-humani metapneumovirus, R-respiratorni sincicijski virus, A-adenovirus, INF B-virus influence B, INF A-virus influence A, P-virus parainfluence, NT-ni testirano, POZ-pozitivno, NEG-negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	Vzorec	DIF	RT-PCR (INF A)	Ct
01/01/2008	Ž	12 let	b. NF	NEG	NEG	
01/01/2008	M	16 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
01/01/2008	Ž	13 mesecev	b. NF	MPV POZ	NEG	
02/01/2008	M	4 mesece	b. NF	NEG	NEG	
02/01/2008	Ž	18 mesecev	b. NF	MPV POZ	NEG	
02/01/2008	Ž	8 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
02/01/2008	Ž	5 let	b. žrela	NEG	NEG	
03/01/2008	M	3 leta	b. NF	R-POZ	NEG	
03/01/2008	M	3 leta	AT	NEG	NEG	
03/01/2008	M	12 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
03/01/2008	Ž	12 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
04/01/2008	M	21 mesecev	AT	NEG	NEG	
04/01/2008	Ž	3 leta	b. NF	NEG	POZ	32,85
04/01/2008	M	14 mesecev	AT	NEG	NEG	
04/01/2008	M	26 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
04/01/2008	M	34 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
05/01/2008	Ž	12 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
05/01/2008	Ž	3 leta	b. NF	MPV NEG	NEG	
05/01/2008	M	25 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
07/01/2008	Ž	16 let	b. žrela	NEG	POZ	37,73
07/01/2008	M	7 mesecev	b. NF	MPV POZ	NEG	
07/01/2008	M	5 let	b. NF	NEG	NEG	
07/01/2008	M	20 mesecev	b. NF	MPV POZ	NEG	
07/01/2008	Ž	11 let	b. NF	NEG	NEG	
08/01/2008	Ž	2 meseca	b. NF	R-POZ	NEG	
08/01/2008	M	9 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
09/01/2008	M	1 mesec	AT	NEG	NEG	
09/01/2008	Ž	8 mesecev	AT	NEG	NEG	
09/01/2008	Ž	8 let	b. NF	NEG	NEG	
09/01/2008	Ž	14 let	b. žrela	NEG	NEG	
09/01/2008	Ž	17 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
09/01/2008	M	9 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
09/01/2008	M	8 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
09/01/2008	M	4 leta	b. žrela	NEG	POZ	37,28
09/01/2008	M	10 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
10/01/2008	Ž	30 let	b. žrela	NEG	NEG	
11/01/2008	Ž	8 let	b. žrela	NEG	NEG	
11/01/2008	M	3 leta	b. NF	MPV POZ	NEG	
12/01/2008	M	10 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
12/01/2008	M	3 leta	b. žrela	POZ INFA	POZ	28,50

se nadaljuje

## Nadaljevanje

**Priloga A1:** Seznam 238 vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času in rezultati rutinskega testiranja z DIF. Okrajšave: MPV-humani metapnevmovirus, R-respiratorni sincicijski virus, A-adenovirus, INF B-virus influence B, INF A-virus influence A, P-virus parainfluence, NT-ni testirano, POZ-pozitivno, NEG-negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	Vzorec	DIF	RT-PCR (INF A)	Ct
14/01/2008	Ž	42 let	BAL	NEG	POZ	32,56
14/01/2008	M	64 let	b. žrela	NEG	NEG	
14/01/2008	M	75 let	b. žrela	NEG	NEG	
14/01/2008	M	12 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
14/01/2008	Ž	28 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
14/01/2008	M	15 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
14/01/2008	Ž	3 leta	b. NF	MPV POZ	NEG	
14/01/2008	Ž	19 mesecev	b. NF	MPV POZ	NEG	
15/01/2008	M	6 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
16/01/2008	M	17 let	b. NF	NEG	NEG	
17/01/2008	Ž	22 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
17/01/2008	M	4 leta	b. žrela	NEG	NEG	
17/01/2008	Ž	22 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
17/01/2008	Ž	31 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
18/01/2008	Ž	44 let	b. žrela	NEG	NEG	
18/01/2008	M	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
18/01/2008	Ž	6 let	b. žrela	NEG	POZ	34,46
18/01/2008	M	16 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
18/01/2008	Ž	4 mesece	b. NF	MPV POZ	NEG	
18/01/2008	M	15 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
19/01/2008	M	11 mesecev	b. NF	P-1-POZ	NEG	
20/01/2008	Ž	17 let	b. NF	NEG	NEG	
20/01/2008	M	24 mesecev	b. NF	NEG	POZ	28,68
20/01/2008	M	41 let	b. žrela	NEG	POZ	25,47
21/01/2008	Ž	82 let	b. žrela	NEG	NEG	
21/01/2008	Ž	16 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
21/01/2008	M	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
21/01/2008	Ž	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
22/01/2008	M	73 let	b. žrela	NEG	NEG	
22/01/2008	M	1 mesec	b. žrela	NEG	NEG	
22/01/2008	M	16 let	b. NF	NEG	NEG	
22/01/2008	M	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
22/01/2008	Ž	21 mesecev	b. žrela	MPV POZ	NEG	
22/01/2008	M	26 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
22/01/2008	M	26 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
22/01/2008	Ž	12 mesecev	b. NF	MPV POZ	NEG	
23/01/2008	M	11 let	b. žrela	NEG	NEG	
23/01/2008	M	6 let	BAL	NEG	POZ	27,69
23/01/2008	Ž	5 let	b. NF	NEG	NEG	
23/01/2008	M	7 let	b. NF	NEG	POZ	35,99

se nadaljuje

## Nadaljevanje

**Priloga A1:** Seznam 238 vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času in rezultati rutinskega testiranja z DIF. Okrajšave: MPV-humani metapnevmovirus, R-respiratorni sincicijski virus, A-adenovirus, INF B-virus influence B, INF A-virus influence A, P-virus parainfluence, NT-ni testirano, POZ-pozitivno, NEG-negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	Vzorec	DIF	RT-PCR (INF A)	Ct
23/01/2008	M	2 meseca	b. NF	R-POZ	NEG	
23/01/2008	M	10 let	BAL	NEG	NEG	
23/01/2008	Ž	6 let	b. NF	NEG	POZ	38,22
23/01/2008	M	15 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
24/01/2008	M	6 let	b. NF	NEG	NEG	
24/01/2008	Ž	17 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
24/01/2008	M	9 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
24/01/2008	M	10 let	b. NF	NEG	NEG	
24/01/2008	M	12 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
24/01/2008	M	5 mesecev	b. NF	MPV POZ	NEG	
24/01/2008	Ž	88 let	b. žrela	NEG	NEG	
25/01/2008	M	72 let	b. žrela	NEG	NEG	
25/01/2008	M	9 let	b. žrela	NEG	NEG	
25/01/2008	Ž	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
25/01/2008	Ž	17 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
25/01/2008	Ž	6 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
26/01/2008	Ž	82 let	b. žrela	NEG	NEG	
26/01/2008	M	15 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
26/01/2008	M	5 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
28/01/2008	M	15 let	b. žrela	NEG	NEG	
28/01/2008	M	65 let	b. žrela	NEG	NEG	
29/01/2008	Ž	17 let	b. žrela	NEG	NEG	
30/01/2008	M	73 let	b. žrela	NEG	NEG	
30/01/2008	M	31 mesecev	b. NF	MPV-POZ	NEG	
30/01/2008	M	18 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
31/01/2008	M	6 let	b. žrela	NEG	NEG	
31/01/2008	M	3 leta	AT	NEG	NEG	
31/01/2008	M	14 let	b. NF	NEG	NEG	
31/01/2008	M	26 mesecev	b. NF	MPV-POZ	NEG	
31/01/2008	M	16 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
01/02/2008	M	2 meseca	AT	NEG	NEG	
01/02/2008	Ž	35 mesecev	b. NF	NEG	POZ	35,44
01/02/2008	M	11 mesecev	b. NF	POZ INFA	POZ	27,95
01/02/2008	Ž	5 let	b. žrela	NEG	NEG	
02/02/2008	M	17 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
02/02/2008	Ž	7 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
02/02/2008	M	3 leta	b. NF	MPV-POZ	NEG	
02/02/2008	M	8 let	b. NF	MPV-POZ	NEG	
04/02/2008	Ž	16 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
04/02/2008	M	18 let	b. žrela	NEG	NEG	

se nadaljuje

## Nadaljevanje

**Priloga A1:** Seznam 238 vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času in rezultati rutinskega testiranja z DIF. Okrajšave: MPV-humani metapnevmovirus, R-respiratorni sincicijski virus, A-adenovirus, INF B-virus influence B, INF A-virus influence A, P-virus parainfluence, NT-ni testirano, POZ-pozitivno, NEG-negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	Vzorec	DIF	RT-PCR (INF A)	Ct
04/02/2008	M	5 let	b. žrela	NEG	NEG	
04/02/2008	M	4 leta	b. NF	NEG	NEG	
04/02/2008	M	13 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
04/02/2008	M	16 mesecev	b. žrela	R-POZ	NEG	
04/02/2008	Ž	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
04/02/2008	M	57 let	b. žrela	NEG	NEG	
05/02/2008	Ž	34 let	b. žrela	POZ INFA	POZ	24,43
05/02/2008	Ž	33 let	b. žrela	NEG	NEG	
05/02/2008	M	42 let	b. žrela	NEG	NEG	
05/02/2008	Ž	40 let	b. žrela	NEG	NEG	
05/02/2008	Ž	83 let	b. žrela	NEG	NEG	
05/02/2008	M	61 let	b. žrela	NEG	NEG	
05/02/2008	Ž	12 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
05/02/2008	M	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
05/02/2008	Ž	3 leta	b. žrela	NEG	NEG	
06/02/2008	Ž	23 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
06/02/2008	M	10 mesecev	b. žrela	A-NEG	NEG	
06/02/2008	M	16 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
06/02/2008	Ž	76 let	b. nosu	NEG	NEG	
07/02/2008	M	47 let	BAL	NEG	NEG	
07/02/2008	Ž	14 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
07/02/2008	Ž	1 mesec	b. NF	R-POZ	NEG	
07/02/2008	M	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
07/02/2008	M	6 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
07/02/2008	M	13 let	b. NF	NEG	NEG	
07/02/2008	Ž	27 mesecev	b. NF	MPV-POZ	NEG	
08/02/2008	M	4 leta	b. žrela	NEG	POZ	27,72
08/02/2008	Ž	21 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
09/02/2008	M	77 let	b. žrela	NEG	NEG	
09/02/2008	M	6 let	b. NF	NEG	NEG	
09/02/2008	Ž	7 let	b. NF	INFB-POZ	NEG	
09/02/2008	M	10 mesecev	AT	NEG	NEG	
09/02/2008	M	15 let	b. žrela	NEG	NEG	
09/02/2008	Ž	12 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
09/02/2008	Ž	17 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
10/02/2008	Ž	17 mesecev	AT	NEG	NEG	
10/02/2008	Ž	1 mesec	b. NF	NEG	NEG	
10/02/2008	M	19 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
10/02/2008	Ž	11 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
11/02/2008	Ž	59 let	b. žrela	NEG	NEG	

se nadaljuje



## Nadaljevanje

**Priloga A1:** Seznam 238 vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času in rezultati rutinskega testiranja z DIF. Okrajšave: MPV-humani metapnevmovirus, R-respiratorni sincicijski virus, A-adenovirus, INF B-virus influence B, INF A-virus influence A, P-virus parainfluence, NT-ni testirano, POZ-pozitivno, NEG-negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	Vzorec	DIF	RT-PCR (INF A)	Ct
11/02/2008	Ž	33 let	b. žrela	NEG	NEG	
11/02/2008	Ž	57 let	b. žrela	NEG	NEG	
11/02/2008	Ž	5 let	b. žrela	NEG	POZ	38,76
11/02/2008	M	10 let	b. NF	NEG	NEG	
12/02/2008	Ž	13 let	b. NF	NEG	NEG	
12/02/2008	Ž	16 let	b. NF	NEG	NEG	
12/02/2008	M	9 let	b. NF	NEG	NEG	
12/02/2008	Ž	84 let	b. žrela	NEG	NEG	
13/02/2008	M	67 let	b. žrela	NEG	NEG	
13/02/2008	Ž	82 let	b. žrela	NEG	NEG	
13/02/2008	M	18 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
13/02/2008	M	0	b. žrela	NEG	NEG	
13/02/2008	M	9 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
14/02/2008	Ž	56 let	b. NF	NEG	NEG	
15/02/2008	Ž	75 let	b. žrela	NEG	NEG	
15/02/2008	Ž	16 let	b. žrela	NEG	NEG	
15/02/2008	M	23 mesecev	b. žrela	NEG	NEG	
15/02/2008	M	35 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
15/02/2008	Ž	12 let	b. žrela	NEG	NEG	
16/02/2008	M	10 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
16/02/2008	Ž	14 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
17/02/2008	Ž	9 mesecev	AT	NEG	NEG	
18/02/2008	M	11 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
18/02/2008	M	6 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
18/02/2008	M	1 mesec	AT	R-POZ	NEG	
18/02/2008	M	24 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
18/02/2008	M	18 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
18/02/2008	M	24 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
19/02/2008	Ž	3 leta	b. NF	NEG	NEG	
19/02/2008	Ž	4 leta	b. NF	R-POZ	NEG	
19/02/2008	Ž	86 let	b. žrela	NEG	NEG	
19/02/2008	Ž	58 let	b. žrela	NEG	NEG	
20/02/2008	Ž	56 let	b. žrela	NEG	NEG	
20/02/2008	Ž	29 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
20/02/2008	M	2 meseca	b. žrela	NEG	NEG	
20/02/2008	Ž	3 mesece	b. NF	NEG	NEG	
20/02/2008	M	19 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
20/02/2008	Ž	24 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
20/02/2008	M	10 mesecev	AT	NEG	NEG	
21/02/2008	M	12 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	

se nadaljuje

## Nadaljevanje

**Priloga A1:** Seznam 238 vzorcev, ki smo jih testirali z RT-PCR v realnem času in rezultati rutinskega testiranja z DIF. Okrajšave: MPV-humani metapneumovirus, R-respiratorni sincicijski virus, A-adenovirus, INF B-virus influence B, INF A-virus influence A, P-virus parainfluence, NT-ni testirano, POZ-pozitivno, NEG-negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	Vzorec	DIF	RT-PCR (INF A)	Ct
21/02/2008	M	5 let	AT	R-POZ	NEG	
21/02/2008	Ž	27 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
21/02/2008	Ž	2 meseca	b. NF	R-POZ	NEG	
21/02/2008	M	15 mesecev	b. NF	A-POZ	NEG	
21/02/2008	M	61 let	b. žrela	NEG	NEG	
22/02/2008	M	37 let	b. žrela	NEG	NEG	
22/02/2008	M	18 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
22/02/2008	M	1 mesec	b. žrela	NEG	NEG	
22/02/2008	Ž	12 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
22/02/2008	M	21 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
23/02/2008	Ž	12 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
23/02/2008	M	8 let	b. NF	NEG	NEG	
25/02/2008	M	18 let	b. NF	NEG	NEG	
25/02/2008	M	20 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
25/02/2008	M	4 leta	b. NF	INFB-POZ	NEG	
25/02/2008	Ž	19 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
25/02/2008	Ž	24 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
25/02/2008	Ž	17 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
25/02/2008	Ž	28 mesecev	b. žrela	NT	NEG	
25/02/2008	Ž	22 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
25/02/2008	M	15 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
25/02/2008	M	30 let	b. žrela	NEG	NEG	
26/02/2008	Ž	74 let	b. žrela	NEG	NEG	
26/02/2008	M	38 let	b. žrela	NEG	NEG	
26/02/2008	Ž	62 let	b. žrela	NEG	NEG	
26/02/2008	Ž	35 mesecev	b. NF	A-POZ	NEG	
26/02/2008	Ž	27 mesecev	b. NF	R-POZ	NEG	
26/02/2008	M	3 leta	b. NF	R-POZ	NEG	
27/02/2008	M	10 let	AT	NEG	NEG	
27/02/2008	Ž	10 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
27/02/2008	M	7 let	BAL	NT	NEG	
27/02/2008	M	18 mesecev	b. NF	NEG	NEG	
27/02/2008	Ž	41 let	b. žrela	NEG	POZ	30,06
27/02/2008	Ž	29 let	b. žrela	NEG	NEG	
28/02/2008	M	45 let	b. žrela	NEG	NEG	
28/02/2008	Ž	13 let	AT	NEG	NEG	
28/02/2008	Ž	28 mesecev	b. NF	R-NEG	POZ	38,57
29/02/2008	M	48 let	b. žrela	NEG	NEG	