

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janja ŠKRLEC

**DOKAZOVANJE ADENOVIRUSOV V FECESU Z
VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF ADENOVIRUSES IN FECES WITH
REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija univerzitetnega 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 Janja Škrlec 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.

Janja Škrlec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 578.7.083 : 578.826 : 577.2.08(043) = 163.6

KG adenovirusi/enterični adenovirusi/gastroenteritis/elektronska mikroskopija/ELISA
test/osamitev nukleinske kisline/PCR v realnem času/interna kontrola

AV ŠKRLEC, Janja

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 2010

IN DOKAZOVANJE ADENOVIRUSOV V FECESU Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XII, 58 str., 13 pregl., 18 sl., 1 pril., 39 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Enterični adenovirusi (AdF) so poleg najbolj znanih rotavirusov eni izmed glavnih povzročiteljev blažjih črevesnih okužb pri mlajših otrocih. Namen našega dela je bil preizkusiti molekularno metodo PCR v realnem času za dokaz adenovirusne (Adv) DNA v iztrebkih bolnikov s simptomi virusnega gastroenteritisa. Rezultate, ki smo jih pridobili z metodo PCR, smo primerjali z rezultati standardnih diagnostičnih metod - encimskoimunske metode (ELISA), ki je specifična samo za vrsto AdF in elektronske mikroskopije (EM). Zanimalo nas je tudi, katere vrste Adv se poleg AdF morebiti še izločajo v blatu in v kakšnih relativnih koncentracijah. Zaradi možne prisotnosti inhibitorjev reakcije PCR v fecesu bolnikov smo v procesiranje vzorcev vključili interno kontrolo. Testirali smo 203 vzorce bolnikov, ki so bili v času med 28.10.2008 in 27.12.2008 poslani v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteričnih virusov v Ljubljani. Iz vzorcev smo osamili virusno DNA in jo pomnožili z metodo PCR v realnem času specifično za vsako od adenovirusnih vrst. Od skupno 203 vzorcev so z EM Adv okužbo potrdili v 7,4 %, s testom ELISA pa AdF v 10,3 %. Z molekularno metodo smo Adv dokazali v 15,8 % vzorcev. Poleg AdF smo v iztrebu dokazali tudi druge adenovirusne vrste. S primerjavo Ct vrednosti vzorcev smo ugotovili, da je količina adenovirusne DNA največja v vzorcih, ki sta jih kot pozitivne opredelili tudi standardni diagnostični metodi. Določili smo razmeroma visok delež inhibicij pomnoževanja virusne DNA in z uporabo govejega serumskega albumina večino inhibicij odpravili. Na podlagi izsledkov našega dela lahko sklepamo, da je metoda PCR v realnem času bolj občutljiva od rutinskih metod, da je Adv gastroenteritis pogostejši pri mlajših otrocih in da se v iztrebu bolnikov s simptomi Adv gastroenteritisa poleg AdF izločajo tudi druge vrste Adv, vendar pa njihova vloga pri nastanku gastroenteritisa ni jasna.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.7.083 : 578.826 : 577.2.08(043) = 163.6
CX adenoviruses/enteric adenoviruses/gastroenteritis/electron microscopy/ELISA assay/extraction of nucleic acid/real-time PCR/internal control
AU ŠKRLEC, Janja
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 2010
TI DETECTION OF ADENOVIRUSES IN FECES WITH REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 58 p., 13 tab., 18 fig., 1 app., 39 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Besides the most common rotaviruses, enteric adenoviruses are one of the main causes of gastrointestinal infections in young children. The course of the disease is generally mild. The purpose of our study was to evaluate real-time PCR method for detection of adenovirus DNA (Adv) in feces of the patients with viral gastroenteritis. The results from our study were compared to those gathered by diagnostic methods of enzyme immunoassay (ELISA), which is specific for AdF only, and electron microscopy (EM). In addition, we were also interested if DNA of other Adv species is also present in the feces and in what relative amount. Internal amplification control was included in PCR reactions to test for the presence of the PCR inhibitors in samples of feces. 203 samples of patients were tested, which were sent to the Laboratory for electron microscopy and diagnostics of gastroenteric viruses in Ljubljana in the period between October 28th 2008 and December 27th 2008. Viral DNA was isolated from the samples, and multiplied by real time PCR specific for each of the Adv species. In a total of 203 samples, the EM method confirmed Adv in 7,4 % while the ELISA test confirmed AdF in 10,3 %. With molecular method we confirmed Adv in 15,8 % samples. Besides AdF, other types of Adv were present in the tested samples of feces. When comparing the Ct values of samples that amount of viral DNA was higher in the samples which were confirmed both with standard diagnostic methods and with the real-time PCR. We have also detected a high percentage of inhibition of viral DNA amplification and, using a bovine serum albumin, we eliminated the majority of inhibition. Based on the results of our study we can conclude that the method of real-time PCR is more sensitive than the routine methods. The results also show that Adv gastroenteritis is more common in young children and that besides AdF more Adv species are present in the feces samples. However, their role in the development of viral gastroenteritis is not clear.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ADENOVIRUSI.....	3
2.1.1 Taksonomska uvrstitev	3
2.1.2 Morfologija in zgradba	3
2.1.3 Razmnoževanje in virusni genom	4
2.1.4 Patogeneza in imunost.....	6
2.1.5 Bolezen in klinični znaki	6
2.1.5.1 Okužbe dihal.....	7
2.1.5.2 Okužbe oči.....	7
2.1.5.3 Okužbe pri imunsko pomanjkljivih osebah	8
2.2 ENTERIČNI ADENOVIRUSI.....	8
2.2.1 Bolezen in klinični znaki	8
2.2.2 Morfološke posebnosti.....	8
2.2.3 Patogeneza	9
2.2.4 Epidemiologija	9
2.2.5 Zdravljenje in preprečevanje	10
2.2.6 Laboratorijska diagnostika	10
2.2.6.1 Elektronska mikroskopija	11
2.2.6.2 Encimskoimunska metoda.....	13
2.2.6.3 Osamitev virusne nukleinske kisline	13
2.2.6.4 Pomnoževanje virusne nukleinske kisline.....	14
2.2.6.4.1 Verižna reakcija s polimerazo	14
2.2.6.4.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	16

2.3 OCENA SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI DIAGNOSTIČNIH TESTOV	20
3 MATERIALI IN METODE DELA	22
3.1 MATERIALI	22
3.1.1 Klinični material.....	22
3.1.2 Laboratorijska oprema in aparature.....	22
3.2 METODE DELA.....	23
3.2.1 Elektronska mikroskopija	23
3.2.2 Encimskoimunska metoda	24
3.2.3 Osamitev celokupne nukleinske kisline iz vzorcev	25
3.2.4 PCR v realnem času za adenoviruse	26
3.2.4.1 Reagenti potrebni za izvedbo PCR v realnem času	26
4 REZULTATI.....	32
4.1 REZULTATI PREJETIH VZORCEV	32
4.2 REZULTATI DOLOČANJA ADENOVIRUSNIH OKUŽB S TREMI METODAMI	33
4.3 REZULTATI TIPIZACIJE	34
4.3.1 Rezultati internih kontrol	36
4.3.2 Vrednosti Ct	38
4.3.2.1 Primerjava vrednosti Ct vzorcev glede na elektronsko mikroskopijo in test ELISA	39
4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJE IN TESTA ELISA	40
4.5 IZRAČUN SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI METOD	41
4.5.1 Elektronska mikroskopija (EM)	41
4.5.2 ELISA test	42
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44
5.1 RAZPRAVA	44
5.1.1 Adenovirusne okužbe črevesja	44
5.2 SKLEPI.....	51
6 POVZETEK.....	52
7 VIRI	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Značilnosti človeških adenovirusov in bolezni, ki jih povzročajo (de Jong, 2003: 410).....	7
Preglednica 2: Primerjava rezultatov testiranj rutinskih metod z molekularno metodo PCR v realnem času.....	20
Preglednica 3: Reakcijska mešanica za PCR; adenovirus vrsta F z interna kontrolo – virus EHV in BSA.....	26
Preglednica 4: Reakcijske mešanice za PCR; količina in končna koncentracija začetnih oligonukleotidov in sond za določanje adenovirusov vrst A, B, C, D, E..	27
Preglednica 5: Vrstnospecifični začetni oligonukleotidi in sonde za adenovirus, ki smo jih uporabili pri metodi PCR v realnem času (Lion in sod., 2003: 1115).....	29
Preglednica 6: Število in delež pozitivnih in negativnih vzorcev glede na adenovirusno okužbo, dokazanih s tremi različnimi metodami.....	33
Preglednica 7: Število in delež vzorcev, pri katerih smo določili eno ali več vrst adenovirusa.....	34
Preglednica 8: Število in delež pozitivnih vzorcev pri posamezni vrsti adenovirusa.....	35
Preglednica 9: Število pozitivnih vzorcev na prisotnost različnih vrst adenovirusa hkrati.	
	35
Preglednica 10: Delež popolne inhibicije vzorcev glede na dodano interna kontrolo, pred in po dodatku BSA.	37
Preglednica 11: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev na okužbo z adenovirusi vrste AdF s testom ELISA in elektronsko mikroskopijo.	40
Preglednica 12: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev na okužbo z adenovirusi z metodo PCR v realnem času in elektronsko mikroskopijo.....	41
Preglednica 13: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev na okužbo z adenovirusi vrste AdF z metodo PCR v realnem času in testom ELISA.....	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz adenovirusa, ki prikazuje ikozaedrično kapsido, vlakna in glavne virusne beljakovine (ExPASy Proteomics Server..., 2009).....	4
Slika 2: Poenostavljen genom adenovirusa serotipa 2 (Murray in sod., 2005: 535).....	5
Slika 3: Primerjava pozitivnega in negativnega kontrastiranja vzorca (herpesvirus) (Hazelton in Gelderblom, 2003: 299).	12
Slika 4: Osamitev nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Roche Applied..., 2008).	14
Slika 5: Shematski prikaz reakcije PCR (Bienz, 2005: 410).	15
Slika 6: Princip delovanja PCR v realnem času s sondom TaqMan (R – reporterski fluorogen, Z – zaviralni fluorogen) (Applied Biosystems..., 2009).....	17
Slika 7: Krivulje pomnoževanja tarčnega dela nukleinske kisline z metodo PCR v realnem času (Valasek in Repa, 2005: 153).	18
Slika 8: Primer homologne interne kontrole (Espy in sod., 2006: 176).	19
Slika 9: »Sendvič« ELISA za dokazovanje virusnih antigenov (The future of things..., 2007).24	
Slika 10: Starostna skupina bolnikov s simptomi virusnega gastroenteritisa, katerih iztrebki so bili poslani v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov.....	32
Slika 11: Število pozitivnih vzorcev na adenovirusno okužbo pri različni starostni skupini bolnikov, dokazanih z elektronsko mikroskopijo.....	33
Slika 12: Število pozitivnih vzorcev na adenovirusno okužbo pri različni starostni skupini bolnikov, dokazanih s testom ELISA.....	33
Slika 13: Število pozitivnih vzorcev na adenovirusno okužbo pri različni starostni skupini bolnikov, dokazanih z metodo PCR v realnem času.....	34
Slika 14: Izris krivulj računalniškega programa aparature za PCR v realnem času za vzorce, pri katerih v reakcijsko mešanico nismo dodali BSA.....	36
Slika 15: Izris krivulj računalniškega programa aparature za PCR v realnem času za vzorce, pri katerih smo v reakcijsko mešanico dodali BSA.....	37
Slika 16: Delež vzorcev, pri katerih se dodana interna kontrola ni pomnožila glede na starostno skupino preiskovancev.....	38

Slika 17: Okvirji z ročaji za vrednost Ct vrste adenovirusov C, E in F. Slika prikazujejo mediano, kvartile, največjo in najmanjšo vrednost Ct ter osamelec.	39
Slika 18: Okvirji z ročaji za vrednosti Ct glede na rezultate rutinskih diagnostičnih metod – elektronske mikroskopije in testa ELISA.....	40

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AdA (B, C, D, E, F)	različne vrste adenovirusov
Arg-Gly-Asp	motiv beljakovine (aminokisline arginin-glicin-asparagine kislina)
BHQ	black hole quencher
BLAST	iskalnik homolognih sekvenc (angl. basic local alignment search tool)
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
CAR	celični receptor pri kokseki- in adenovirusu (angl. coxsackievirus and adenovirus receptor)
Ct	fluorescenčni prag (angl. threshold cycle)
DABCYL	4,4 - dimetilamino - azobenzenen - 4' – karboksilna kislina
ddH ₂ O	demineralizirana destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
dsDNA	dvojnovijačna DNA (angl. double-stranded DNA)
dUTP	deoksiuracil trifosfat
EHV1	equine herpesvirus type 1
ELISA	enzimskoimunska metoda (angl. enzyme immunoassay oz. enzyme-linked immunosorbent assay)
EM	elektronska mikroskopija
EMI	laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov
F	pozitivno usmerjeni začetni oligonukleotid (angl. Forward Primer)
FAM	karboksi-fluorescein
FRET	prenos fluorescenčne resonančne energije (angl. fluorescence resonance energy transfer)
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HIV	človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)

LN	lažno negativen rezultat testa
LP	lažno pozitiven rezultat testa
MHC I	histokompatibilni kompleks I (angl. major histocompatibility complex)
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina (angl. messenger ribonucleic acid)
NCBI	national center for biotechnology information
NEG	negativen vzorec
nM	nanomolarna koncentracija ($\frac{nmol}{L}$)
OD	optična gostota (angl. optical density)
P	sonda (angl. Proba)
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
POZ	pozitiven vzorec
R	negativno usmerjeni začetni oligonukleotid (angl. Reverse Primer)
real-time PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. real-time polymerase chain reaction)
RN	resnično negativen rezultat testa
ROX TM	6-karboksi- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilrodamin
RP	resnično pozitiven rezultat testa
TAMRA	karboksi-tetrametil-rodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UNG	uracil-N-glikozilaza
UV	ultravijolično sevanje (angl. ultraviolet radiation)
VA RNA	kratki segmenti RNA (angl.: virus-associated RNA)
VIC	lastnik imena je Applied Biosystems
VIN	laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij

1 UVOD

Akutni virusni gastroenteritis je pogosta bolezen predvsem pri otrocih, mlajših od pet let. V tej skupini otrok vsako leto zabeležijo več kot 700 milijonov primerov akutne driske. Najpogostejši virusni povzročitelji gastroenteritisa so: rotavirusi, enterični adenovirusi, astrovirusi in človeški kalicivirusi (Wilhelmi in sod., 2003).

Adenovirusni gastroenteritis je nalezljiva bolezen in se najpogosteje prenaša fekalno-oralno (Murray in sod., 2005). Povzroča ga vrsta AdF (serotipa 40 in 41), ki jo uvrščamo v rod *Mastadenovirus*, znotraj družine *Adenoviridae* (Robinson in Echavarría, 2007). Enterični adenovirusi ne povzročajo sezonskih epidemij, kot je to znano pri rotavirusnih okužbah, ampak se pojavljajo vse leto, z manjšim vrhom v toplejših mesecih (Uhnoo in sod., 1984; de Jong, 2003). Infektivnost serotipov 40 in 41 je posledica njune visoke stabilnosti in odpornosti proti encimom črevesja in žolča, kar jima omogoča, da se lahko razmnožujejo v črevesju do visokih titrov (Echavarría, 2008). Posebnosti glikoproteinskih vlaken virusu omogočajo visok tropizem do celic prebavil, številni ostali mehanizmi (npr. izrezovanje intronov) pa uspešen izmk imunskemu odzivu gostitelja (Favier in sod., 2002; Murray in sod., 2005).

Večina okužb z enteričnimi adenovirusi je samoomejujočih in minejo brez posledic v nekaj dneh. Pogoste so asimptomatske okužbe, ki virusu olajšajo širjenje med ljudmi (Murray in sod. 2005). Specifičnega zdravljenja in cepiva za splošno uporabo ni (Wilhelmi in sod., 2003; Ison, 2006).

Diagnostika gastroenteričnih adenovirusnih okužb temelji na neposrednem dokazovanju virusnih antigenov s testom ELISA (angl. enzyme immunoassay oz. enzyme-linked immunosorbent assay) in na identifikaciji virusa z elektronsko mikroskopijo. Virusi se namreč z iztrebkom izločajo v visokih titrih, zato naj bi bila zanesljivost teh metod dovolj dobra. Celične kulture so za dokazovanje enteričnih adenovirusnih okužb neprimerne, saj se ti virusi v laboratorijskih pogojih slabo razmnožujejo (Favier in sod., 2002).

Vse bolj je razširjena uporaba molekularnih tehnik verižne reakcije s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction), ki nam podajo rezultate v nekaj urah, za potrditev okužbe pa zadostuje že nekaj kopij virusne nukleinske kisline (Mackay in sod., 2002).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil preizkusiti molekularno metodo PCR v realnem času (angl. real-time PCR) za dokaz adenovirusne DNA v iztrebku bolnikov s simptomi virusnega gastroenteritisa. Rezultate smo žeeli primerjati s tistimi, ki so jih predhodno že pridobili z diagnostičnima metodama elektronske mikroskopije in testom ELISA, v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov (EMI) na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Pričakovali smo, da bomo z metodo PCR v realnem času zaradi večje občutljivosti molekularne metode dokazali okužbe z adenovirusom v več vzorcih kot z rutinskima metodama.

Domnevali smo tudi, da bomo v vzorcih, v katerih bomo dokazali okužbo le z molekularno metodo, določili manjšo količino virusne DNA kot v vzorcih, pri katerih smo virus dokazali z rutinskima metodama.

Zanimalo nas je tudi, katere vrste adenovirusov se poleg enteričnih morebiti še izločajo v iztrebku. Pričakovali, smo da bomo v vzorcih dokazali nukleinske kisline različnih vrst adenovirusa, a največ DNA vrste AdF.

Z uporabo interne kontrole smo žeeli ugotoviti delež vzorcev pri katerih se pojavi inhibicija. Predvidevali smo pojav inhibicij pomnoževanja nukleinske kisline prav tako pa tudi, da se bo po dodatku govejega serumskega albumina (BSA, angl. bovine serum albumin) delež teh inhibicij zmanjšal.

Predvideli smo, da bo v skupini otrok, mlajših od treh let, pojavnost okužbe večja kot pri starejših preiskovancih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ADENOVIRUSI

Adenovirusne okužbe pogosto prizadenejo predvsem otroke. Najpogosteje se pojavljajo bolezni dihal, prebavil ter vnetje očesne veznice in roženice. Okužba ponavadi mine sama brez trajnih posledic (de Jong, 2003).

2.1.1 Taksonomska uvrstitev

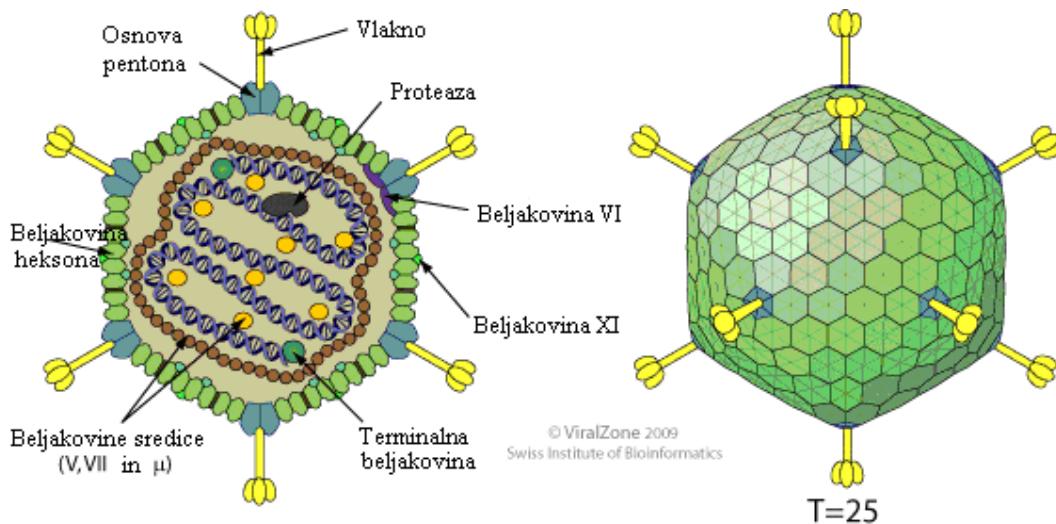
Adenovirusi spadajo v družino *Adenoviridae*, ki jo sestavlja štirje rodovi: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* in *Mastadenovirus*. V slednjega uvrščamo vse adenoviruse, ki okužijo ljudi. Ločimo šest vrst človeških adenovirusov, ki jih označimo s črkami od A do F. Vrsto B (ADB) so kasneje razdelili v dve podvrsti B1 in B2 zaradi razlik v restrikcijskih mestih DNA. Vsaka vrsta vključuje enega ali več serotipov, skupno jih poznamo 51 (Robinson in Echavarría, 2007; de Jong, 2003). Novejše objave (Echavarría, 2008) poročajo o sedmih človeških adenovirusnih vrstah od A do G in o 52 serotipih. Znotraj serotipov opisujejo različne genotipe na podlagi razlik genomske nukleinske kisline, ki so bile prikazane z restrikcijskimi mapami in z določanjem nukleotidnega zaporedja (Echavarría, 2008).

2.1.2 Morfologija in zgradba

Adenovirusi imajo ikozaedrično simetrijo, so brez ovojnica in spadajo med srednje velike virusa s premerom od 70 do 90 nm (Murray in sod. 2005). Njihova kapsida je sestavljena iz 252 kapsomer, med katerimi je 240 heksonov in 12 pentonov. Vsak penton je iz osnove in glikoproteinskega vlakna, na katerega je pripeta beljakovina, ki je pomembna za prpenjanje virusa s celičnim receptorjem gostitelja (Slika 1). Pentoni z vlakni imajo tipsko in tudi vrstno specifične antigenske komponente, zato so odgovorni za hemaglutinacijo *in vitro* in za klasifikacijo virusov. Heksoni imajo prav tako tipsko specifična mesta, ki sprožijo tvorbo nevtralizacijskih protiteles (Robinson in Echavarría, 2007).

Heksoni vsebujejo beljakovine, ki stabilizirajo virus in so udeležene pri sestavljanju novih virusnih delcev. Beljakovine pentonov in vlakna pa sodelujejo pri vstopu virusa v celico gostitelja.

Genom je linearna molekula dvojnovijačne DNA (dsDNA, angl. double-stranded DNA) in k celotni virusni masi doprinese 15 % (Wilhelmi in sod., 2003).



Slika 1: Shematski prikaz adenovirusa, ki prikazuje ikozaedrično kapsido, vlakna in glavne virusne beljakovine (ExPASy Proteomics Server..., 2009).

2.1.3 Razmnoževanje in virusni genom

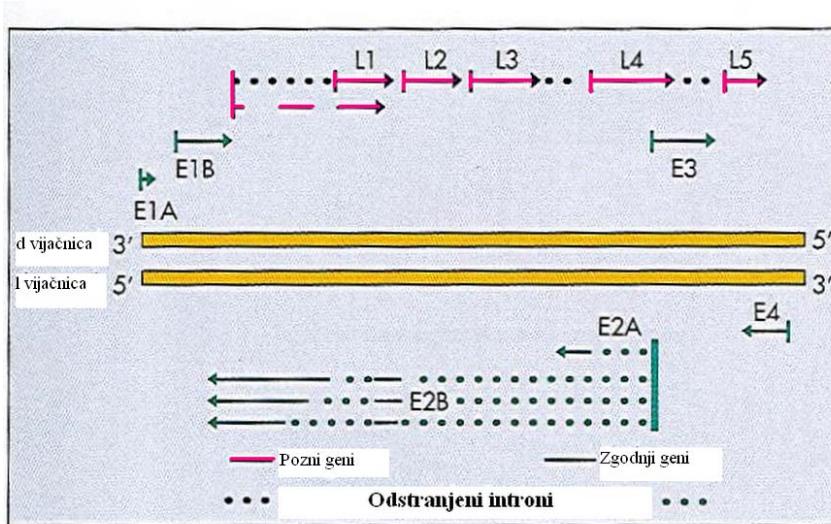
Adenovirusi največkrat okužijo epiteljske celice. Okužba se začne s pritrditvijo beljakovine vlakna na celični receptor CAR (angl. coxsackievirus and adenovirus receptor), nekateri adenovirusi pa uporabljajo molekulo MHC I (angl. major histocompatibility complex). Virus nato z endocitozo vstopi v celico in po lizi endosomalnega mešička se kapsida in DNA ločita. Pomnoževanje in prepisovanje virusne DNA poteka v jedru z virusno DNA polimerazo. Ta uporablja terminalno beljakovino s pripetim citozin monofosfatom kot začetnim oligonukleotidom. Terminalna beljakovina po koncu ostane pripeta na DNA. Strukturne beljakovine pa nastajajo v citoplazmi in se kasneje transportirajo v jedro, kjer v prazne kapside vstopi virusna DNA in beljakovine sredice. Nato se kapsida zapre v kristalno strukturo in virus je popoln. Virusni razmnoževalni cikel traja od 32 do 36 ur in nastane več kot 10000 virusnih delcev na

celico, a le od 1 do 5 % jih je kužnih. Virusi se sprostijo iz celice ob njeni lizi (Robinson in Echavarría, 2007; Murray in sod. 2005).

Prepisovanje virusnih genov poteka iz obeh vijačnic in iz nasprotnih smeri. Geni, ki nosijo zapis za podobne funkcije, so si bližje (Murray in sod. 2005).

Najprej se prepišejo zgodne mRNA (angl. messenger RNA), ki se nato prevedejo v zgodnje beljakovine. Zgodne beljakovine sprožijo pomnoževanje virusnega genoma in preprečijo celično izgradnjo. Sinteza poznih beljakovin pa poteče šele po pomnožitvi virusne DNA, saj predstavljajo primarno strukturo kapside (Murray in sod. 2005).

Zgodnji geni so E1A, E1B, E2, E3 in E4, pozni geni pa od L1 do L5 (Robinson in Echavarría, 2007). Različne mRNA nastanejo z izrezovanjem različnih intronov, a uporabljajo isti promotor in notranja zaporedja. Izrezovanje intronov omogoča večjo pestrost pri sintezi beljakovin. Princip cepitve primarnega prepisa E2 v krajše številnejše mRNA je prikazan na Sliki 2 (Murray in sod. 2005).



Slika 2: Poenostavljen genom adenovirusa serotipa 2 (Murray in sod., 2005: 535).

Geni se prepisujejo iz obeh vijačnic (d in l). Zgodnji geni se prepišejo iz 4 promotorskih zaporedij, pozni pa iz ene. Po primarnem prepisu pride do izrezovanja intronov in nastane popolni repertoar virusnih beljakovin (Murray in sod. 2005).

2.1.4 Patogeneza in imunost

Adenovirusi lahko povzročijo tri različne okužbe: litično (sluzničnoepitelijске celice), latentno (nosnožrelna in druga limfatična tkiva) in maligno preobrazbo celic glodalcev. Slednje pri ljudeh še niso dokazali. Pri imunsko pomanjkljivih bolnikih lahko pride po lokalni okužbi do viremije oz. sistemske okužbe, ki se razširi v ostale organe.

Celično posredovana imunost je pomembna pri omejevanju virusnega širjenja, protitelesa pa služijo kot zaščita pred okužbo z istim serotipom, ne preprečijo pa okužbe z drugimi serotipi.

Adenovirusi imajo številne mehanizme, s katerimi se izognejo obrambi imunskega sistema in tako ostanejo v gostitelju. Beljakovini E3 in E1A preprečita apoptozo okužene celice, saj onemogočita pojav MHC I na celični površini in s tem T celično posredovane imunosti (Murray in sod. 2005). Celično posredovani imunosti pa se izognejo tudi s kratkimi VA RNA (angl. virus-associated RNA). To so nekodirajoči prepisi RNA polimeraze III in nastanejo v pozni fazи virusnega razmnoževanja. Med adenovirusno okužbo se aktivira beljakovinska kinaza, ki fosforilira translacijski faktor, čemur sledi inhibicija virusne beljakovinske sinteze. VA RNA pa blokira aktivacijo beljakovinske kinaze in tako se sinteza virusnih beljakovin nadaljuje (Sano in sod., 2006).

2.1.5 Bolezen in klinični znaki

Spekter adenovirusnih bolezni je velik, predvsem zaradi številnih serotipov in njihovega različnega tropizma do tkiva. Najbolj pogoste so bolezni dihal, oči in prebavil. Poročajo pa tudi o okužbah ledvic, jeter, genitalij, osrednjega živčnega sistema in vse pogosteje o sistemskih okužbah (Robinson in Echavarría, 2007). Dokazano je, da adenovirusni vrsti A in B lahko povzročata tumorje pri novoskotenih hrčkih, ni pa prepričljivega dokaza, da bi katera koli vrsta povzročala tumor pri ljudeh (de Jong, 2003). Serotipe in bolezni prikazuje Preglednica 1.

Preglednica 1: Značilnosti človeških adenovirusov in bolezni, ki jih povzročajo (de Jong, 2003: 410).

Vrsta		Serotipi	Onkogenost	Bolezen
A		12, 18, 31	visoka	redko gastroenteritis pri otrocih
B	B1	3, 7, 16, 21, 50	šibka	bolezni dihal, vnetje očesne veznice, okužbe ledvic
	B2	14, 11, 34, 35		
C		1, 2, 5, 6	nič	bolezni dihal
D		8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36- 39, 42-49, 51	nič	vnetje očesne veznice in roženice
E		4	nič	bolezni dihal, vnetje očesne veznice
F		40, 41	nič	gastroenteritis

2.1.5.1 Okužbe dihal

Okužbe dihal se pojavljajo že zgodaj v otroštvu, ponavadi so mile, minejo same po sebi, več kot polovica pa jih je asimptomatskih. Prevalenca adenovirusnih okužb dihal med otroci je od 2% do 14%. Najpogosteji povzročitelji okužb so vrste B, C in E s serotipi 1, 2, 5 in 6, ki povzročajo endemične okužbe, in serotipi 4, 7, 14 in 21, ki so odgovorni za manjše epidemije, večinoma pozimi. Adenovirusi povzročajo vročino, nahod, vnetje grla, kašelj, občasno tudi vnetje srednjega ušesa ter v težjih primerih bronhitis in pljučnico (Robinson in Echavarría, 2007).

Med vojaškimi novinci kot povzročitelja akutnih dihalnih bolezni prevladujeta serotipa 4 in 7. Za to tvegano skupino so uvedli cepljenje proti omenjenima serotipoma, a so ga leta 1996 ukinili. Zaradi visoke prevalence obolelosti (od 30% do 70%) med necepljenimi novinci ponovno razmišljajo o obveznem cepljenju le-teh (Robinson in Echavarría, 2007).

2.1.5.2 Okužbe oči

Epidemska vnetja očesne veznice in roženice povzročajo serotipi 3, 4 in 7 in so pogostejše v poletnih mesecih zaradi premalo klorirane vode v plavalnih bazenih. Okužbe so največkrat mile in izzvenijo same po sebi (Robinson in Echavarría, 2007).

2.1.5.3 Okužbe pri imunsko pomanjkljivih osebah

Pri imunsko pomanjkljivih osebah so adenovirusne okužbe lahko posledica reaktivacije latentne okužbe ali nove zunanje okužbe. Klinični potek okužbe je odvisen od osnovne bolezni, prizadetosti organskega sistema, starosti bolnika in serotipa. Pogosti so pojavi pljučnice, hepatitisa in sistemskih okužb (Robinson in Echavarría, 2007; Ison, 2006).

2.2 ENTERIČNI ADENOVIRUSI

2.2.1 Bolezen in klinični znaki

Enterični adenovirusi so takoj za rotavirusi drugi najpogostejši povzročitelji akutnega otroškega gastroenteritisa. Adenovirusni gastroenteritis je pogost pri otrocih, mlajših od dveh let. Okužbe s serotipom 40 bi naj bile pogostejše pri otrocih do 12. meseca starosti, okužbe s serotipom 41 pa pri otrocih nad to starostjo (Robinson in Echavarría, 2007; Uhnoo in sod. 1984; Wood, 1988).

Za razliko od rotavirusnih okužb, kjer je prevalenca obolelosti večja pozimi, so eneterične adenovirusne okužbe razporejene čez vso leto, ne glede na sezono. Manjši vrh okužb so opazili v juliju oz. v toplejših mesecih (Uhnoo in sod. 1984).

Inkubacijska doba je od 3 do 10 dni. Driska, ki je najbolj izstopajoč klinični znak, je običajno vodena, nekrvava, brez levkocitov in traja okrog 10 dni. Pojavljajo pa se lahko tudi blaga vročina, bruhanje in krčevite bolečine v trebuhu (Robinson in Echavarría, 2007). Driska, ki jo povzroča serotip 41, bi naj bila dolgotrajnejša (12,2 dni) od tiste s serotipom 40 (8,6 dni). Hujše dehidracije so redke, čeprav poročajo tudi o smrtnih primerih med bolniki s pomanjkljivim imunskim sistemom (Uhnoo in sod. 1984; Wood, 1988).

2.2.2 Morfološke posebnosti

Poleg že prej opisanih strukturnih lastnosti adenovirusov imata enterična serotipa nekaj posebnosti, po katerih se ločita od ostalih. Te značilnosti naj bi prispevale k temu, da imata tropizem le do celic prebavnega trakta in ne povzročata drugih okužb.

Njuna glikoproteinska vlakna so dveh različnih primarnih aminokislinskih zaporedij in dolžin. Z elektronskim mikroskopiranjem Ad41 so ugotovili, da je dolžina daljšega vlakna

340 ± 13 Å in krajšega 200 ± 13 Å. Razmerje med njima je 1:1. Le daljše vlakno se veže s CAR na epitelijskih celicah, krajše pa z drugimi specifičnimi receptorji v prebavilih. Z molekularno analizo so ugotovili, da enterična serotipa nimata Arg-Gly-Asp motiva v gibljivi regiji pentona, kot ga imajo drugi serotipi, zato bi naj bil njun vstop v celico neodvisen od MHC I kompleksa. Celični tropizem teh serotipov je precej drugačen od ostalih CAR specifičnih serotipov (tistih, ki povzročajo okužbo dihal) (Favier in sod., 2002).

2.2.3 Patogeneza

Enterična serotipa 40 in 41 v črevesnih epitelijskih enterocitih povzročata spremembe, kar vodi do oslabitve celotnega mikrovila. Posledično je resorpcija hranil in tekočine iz črevesja nepopolna kar vodi do osmotske driske (Wilhelmi in sod., 2003).

2.2.4 Epidemiologija

Kljub temu da so adenovirusi goli, so zelo odporni proti fizikalnim in kemijskim dejavnikom. Na sobni temperaturi ostanejo kužni tudi do tri tedne. Prenos je običajno fekalno-oralen, v primeru okužb dihal tudi kapljičen. Odporni so proti nizkim temperaturam ter želodčnim in žolčnim sokovom, kar jim omogoča razmnoževanje v črevesju do visokih titrov (Echavarría, 2008). Večina okužb je asimptomatskih, kar doprinese k širjenju virusa med ljudmi (Murray in sod. 2005). Otroci izločajo nekatere neenterične adenoviruse v iztrebku tudi od 3 do 6 tednov po prenehanju okužbe, enterična serotipa pa se v iztrebku izločata od 7 do 14 dni po prenehanju gastroenteritisa (Robinson in Echavarría, 2007; Wood, 1988).

Incidenca adenovirusne driske pri otrocih je odvisna od okolja in poročajo, da je v razvitih območjih od 1% do 8%, v deželah v razvoju pa od 2% do 31% (Wilhelmi in sod., 2003).

2.2.5 Zdravljenje in preprečevanje

Specifičnega zdravljenja ni. Zdravljenje poteka simptomatsko z ustreznim rehidracijom. Rehidracijsko tekočino je potrebno začeti dajati dovolj zgodaj, da se nadomesti voda, ki jo je bolnik izgubil zaradi driske ali bruhanja (Wilhelmi in sod., 2003).

Bolnike s pomanjkljivim imunskim sistemom, ki zbolevajo tudi za hujšo obliko katere od adenovirusnih okužb, zdravijo s cidovirom. Zdravilo je kljub svoji toksičnosti primerno za zdravljenje bolnikov s sistemsko adenovirusno okužbo, saj je edino, ki ima *in vitro* in *in vivo* podatke o delovanju proti vsem serotipom adenovirusov (Ison , 2006).

Za splošno uporabo na tržišču ni cepiva. V preteklosti so cepivo uporabljali za preventivo adenovirusnih okužb pri vojaških novincih kot zaščito pred serotipoma 4 in 7 (Murray in sod., 2005).

Enterični adenovirusi so zelo stabilni in odporni patogeni. Prenašajo se tudi po vodi, zato je bistvenega pomena ustrezen kloriranje le-te. Kot alternativo kemičnemu razkuževanju pitne vode omenjajo ultravijolično sevanje (UV). UV sevanje deluje na nukleinsko kislino virusa tako, da povzroči nastanek fotoproduktov kot so timinski dimeri, kar zaustavi pomnoževanje nukleinske kisline in virus propade. Ko in sodelavci (2005) poročajo o poskusu, v katerem so merili nastanek adenovirusne mRNA v okuženi gostiteljski celici v odvisnosti od UV sevanja. Nastanek adenovirusne mRNA v celici je bil dokončen dokaz okužbe. Po postopnem zviševanju UV sevanja do 200 nm se je sinteza mRNA zmanjšala, pri 225 nm pa virusne mRNA v okuženih celicah niso zaznali, kar pomeni, da je virusna DNA bila močno poškodovana (Ko in sod., 2005).

Adenoviruse na površinah inaktivira delovanje natrijevega hipoklorida za 10 minut ali 1 minuta 70% etanola.

V splošnem je potrebno paziti na sanitarno higiensko ureditev okolja, uživanje higiensko neoporečne hrane, osebno higieno in redno, ustrezeno umivanje rok (Echavarría, 2008).

2.2.6 Laboratorijska diagnostika

Enterični adenovirusi se slabo razmnožujejo v celičnih kulturah, zato je na pojav citopatskega učinka potrebno čakati tudi do več tednov. Okužene celične kulture tako propadejo, še preden opazimo razločen citopatski učinek (Ko in sod., 2005).

Zato pri diagnostiki virusnih enteričnih okužb uporabljamo elektronsko mikroskopijo, encimskoimunske metode in vedno pogosteje tudi molekularne metode.

2.2.6.1 Elektronska mikroskopija

Diagnostika gastroenteritičnih adenovirusnih okužb je razmeroma enostavna, saj se virusi v akutni dobi z iztrebkom izločajo v velikem številu (Desselberger in Gray, 2005). Brez predhodne identifikacije virusa lahko s pomočjo elektronske mikroskopije določimo karakteristično morfologijo delcev, če so le-ti v dovolj visoki koncentraciji (10^6 delcev/ml in več) (Echavarria, 2008). V nasprotnem primeru je za elektronsko mikroskopijo znano, da nam poda lažno negativne rezultate (Wood in sod., 1989). Prednost te metode je v hitri izvedbi. Ko je vzorec ustrezno pripravljen, ga izkušeni virolog identificira v 10 minutah. Tako na podlagi morfologije virusa in kliničnih informacij, lahko postavimo diagnozo, ki omogoči hitro začetno zdravljenje (Hazelton in Gelderblom, 2003).

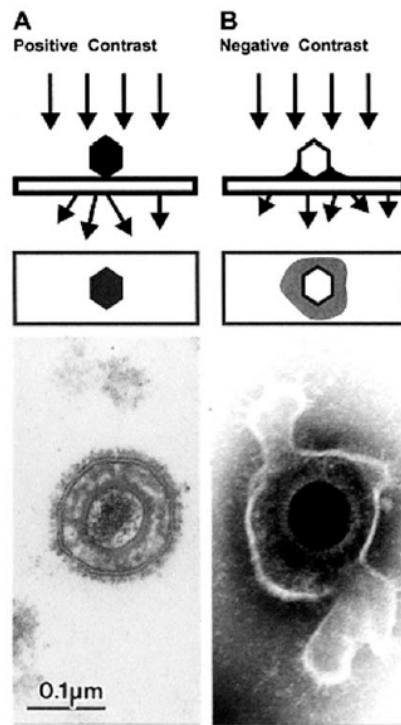
V kolikor je virusa v vzorcu manj, se poslužujemo ene izmed tehnik, s katerimi koncentriramo virusno suspenzijo. To so imunološke in neimunološke metode. Med imunološkimi metodami je poznana imunska agregacija, pri kateri uporabljamo specifična protitelesa za koncentriranje materiala oz. specifično določanje delca. Agregati, ki nastanejo so veliki in jih laže opazimo. Običajno jo uporabljamo za identifikacijo novih povzročiteljev ter majhnih in razpršenih virionov.

K neimunološkim metodam pa spadajo:

- a) ultracentrifugiranje in sedimentacija - material iz suspenzije koncentriramo s sedimentacijo in usedlino nanesemo na mrežico,
- b) agarska difuzija - virusno suspenzijo nakapljam na agarsko površino in na njo položimo mrežico. Kaplja difundira v gojišče (15 - 20 min), virus pa koncentriran ostane na površini,
- c) direktno centrifugiranje v Airfugi (Beckman) - centrifugirka ima na dnu vdolbinico, v katero vstavimo EM mrežico. Po centrifugiranju na mrežici ostane usedlina koncentriranih virusov.

Za pregledovanje virusov v suspenziji, ki zaradi nizke mase in slabih interakcij z elektroni ne zagotavljajo zadostnega kontrasta in ločljivosti, uporabljamo metodo negativnega kontrastiranja. Pri tem okolini s težkimi kovinami zmanjšamo prepustnost za elektrone in le elektroni, ki prehajajo skozi delec, dajejo sliko virusa. Virus »sveti« na temnem ozadju, kot prikazuje Slika 3B. Kot negativna kontrastna sredstva najpogosteje uporabljamo 1% uranilni acetat in 1% fosforvolframovo kislino (Hazelton in Gelderblom, 2003). Gre za t.i. »catch-all« metodo, s katero dobimo informacijo o morfologiji vseh virusov v kužnini (Desselberger in Gray, 2005).

Poznamo pa tudi pozitivno kontrastiranje, ki je zahtevnejše, počasnejše in odvisno od kemijskih reakcij s komponentami objekta (Hazelton in Gelderblom, 2003).



Slika 3: Primerjava pozitivnega in negativnega kontrastiranja vzorca (herpesvirus) (Hazelton in Gelderblom, 2003: 299).

Kljud vsem prednostim, ki jih nudi elektronska mikroskopija, ima dve pomembni omejitvi: nizko občutljivost in subjektivnost. Neuspešna potrditev povzročitelja še ne pomeni, da povzročitelja ni. Pomemben je tudi človeški dejavnik (Hazelton in Gelderblom, 2003).

2.2.6.2 Encimskoimunska metoda

Encimskoimunsko metodo pogosto uporabljamo za dokazovanje respiratornih in gastrointestinalnih okužb, kjer v kužnini neposredno določimo virusne antigene. Metodo odlikuje hitrost in visoka občutljivost (Echavarria, 2008). Občutljivost pri določanju enteričnih adenovirusov z ELISA je več kot 90%, specifičnost testa pa močno povečamo z uporabo monoklonskih protiteles, ki so uperjena proti ohranjenim regijam na heksonskih beljakovinah in je običajno več kot 97% (Robinson in Echavarria, 2007).

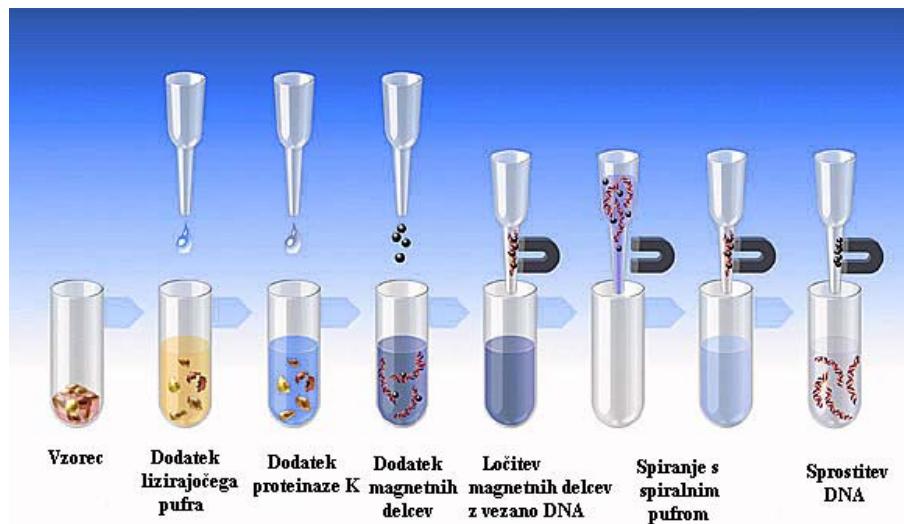
2.2.6.3 Osamitev virusne nukleinske kisline

Metode PCR ne moremo izvesti z neobdelanim materialom iz vzorca, saj bi velike količine inhibitorjev (polisaharidi, urea) in drugih primesi (soli) onemogočile pravilno delovanje encimov. Učinkovita osamitev nukleinske kisline iz kliničnega vzorca je torej pomemben predpogoj za uspešno molekularno določitev virusa (Berensmeier, 2006).

Avtomatizirane metode imajo prednost pred klasičnimi tehnikami osamitve, ki so časovno dolgotrajne ter zaradi številnih ekstrakcij in centrifugiranj običajno omejene z manjšim izkupičkom in nizko stopnjo čistosti nukleinske kisline.

V naši raziskavi uporabljen MagNa Pure Compact omogoča hitro in v celoti avtomatizirano osamitev nukleinske kisline od preostalega vzorca. Sistem omogoča osamitev osmih vzorcev v eni seriji. Predpriprava traja nekje 10 minut, celoten čas osamitve pa 25 minut (Waltenberger in sod., 2004). Metoda omogoča osamitev nukleinske kisline neposredno iz neobdelanega kliničnega vzorca (kri, tkivni homogenat) (Berensmeier, 2006). Sistem je računalniško voden in ima programirane vse faze osamitve nukleinske kisline. To so: liza celic in beljakovin (nukleaz), vezava nukleinske kisline na magnetne delčke, odstranitev primesi in inhibitorjev ter elucija vezane nukleinske kisline pri visoki temperaturi (Kirchgesser in sod., 2003). Drugi komercialno dobavljeni testi elucijo nukleinske kisline izvajajo s spremembou ionske moči pufra ali s spremembou pH (Berensmeier, 2006).

Osamitev nukleinske kisline temelji na tehnologiji magnetnih delcev in magnetizma (Slika 4).



Slika 4: Osamitev nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (Roche Applied..., 2008).

Nukleinska kislina se iz vzorca veže na magnetne delce (magnetit), ki so imobilizirani s sintetičnimi polimeri (agarosa), biopolimeri (celuloza) ali poroznim stekлом. Uporabljajo se tudi delci, ki so osnovani na anorganskih magnetnih materialih, kot je Fe_2O_4 . Ko stalni magnet, ki se nahaja izven tubice, ustvari magnetno polje, se magnetni delci z vezano nukleinsko kislino premaknejo proti njemu in tako pride do ločitve od vzorca. Pomembno je, da magnetni delci ne reagirajo med seboj v odsotnosti magnetnega polja, saj bi se tako zmanjšala površina za vezavo nukleinske kisline in posledično tudi občutljivost metode PCR, kar bi lahko vodilo do lažno negativnih rezultatov.

2.2.6.4 Pomnoževanje virusne nukleinske kisline

2.2.6.4.1 Verižna reakcija s polimerazo

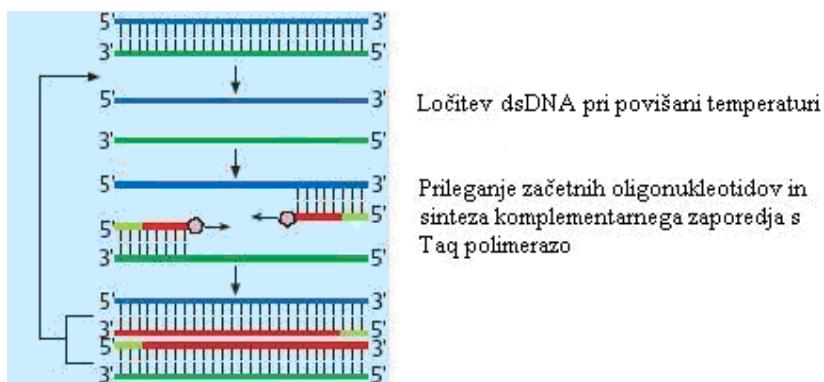
Verižna reakcija s polimerazo je metoda, ki temelji na pomnoževanju specifičnih odsekov nukleinske kisline. Razvoj PCR je pomenil velik napredek v molekularni biologiji, manipulacija z genskim materialom pa je postala veliko lažja (Valasek in Repa, 2005).

Za izvedbo PCR je pomembna pravilna izbira začetnih oligonukleotidov. Le-ti morajo biti izbrani tako, da z visoko zmogljivostjo in specifičnostjo omogočijo pomnožitev želenega

nukleotidnega zaporedja v vzorcu. V izogib navzkrižni vezavi začetnih oligonukleotidov lahko njihovo specifičnost preverimo v bazi podatkov na NCBI (National Center for Biotechnology Information) in sicer s programom BLAST (angl. Basic local alignment search tool) (Espy in sod., 2006). Pri izbiri začetnih oligonukleotidov moramo paziti, da niso predolgi (20–28 nukleotidov) in vsebujejo 40–60% delež nukleotidov G in C. V posameznem začetnem oligonukleotidu naj ne bo komplementarnih regij, prav tako naj ne bo komplementarnih regij na 3' koncu med izbranima paroma, temperatura tališča med njima pa naj se ne razlikuje za več kot 5 °C (Mackay in sod., 2002). Za sintezo komplementarnega zaporedja med obema začetnima oligonukleotidoma uporabljamo Taq polimerazo iz bakterije *Thermus aquaticus*, ki je termostabilna (Valasek in Repa, 2005).

Vsek cikel PCR reakcije je temperaturno uravnavan:

- i) denaturacija dsDNA pri temperaturi višji od 90 °C
- ii) vezava začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50 °C-75 °C
- iii) podaljševanje verige DNA pri temperaturi 72 °C-78 °C



Slika 5: Shematski prikaz reakcije PCR (Bienz, 2005: 410).

Običajno se v eni PCR reakciji zvrsti od 30 do 40 temperaturnih ciklov. Spremljanje pomnožkov, ki jih dobimo pri klasični različici izvedbe PCR, največkrat temelji na gelski elektroforezi in metodi barvanja z etidijevim bromidom. Molekule etidijevega bromida se vgradijo v dsDNA, absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine in nato oddajo svetlobo v vidnem delu spektra, sorazmerno s količino pomnožka. Rešitev takšnega zamudnega procesa je bil razvoj PCR v realnem času (Mackay in sod., 2002).

2.2.6.4.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

PCR v realnem času je izboljšana izvedba klasične PCR (Mackay in sod., 2002). Metoda omogoča pomnoževanje in sprotno spremljanje pomnožkov v istem zaprtem sistemu, kar močno zmanjša verjetnost za navzkrižno kontaminacijo vzorcev med pomnoževanjem in tudi laboratorija/okolja. PCR v realnem času odlikujeta izredna občutljivost, ki omogoča prepoznavanje manj kot petih kopij tarče v vzorcu, in hitrost (Espy in sod., 2006; Valasek in Repa, 2005). Z uporabo specifičnih, s fluorogenom označenih sond, in začetnih oligonukleotidov zagotovimo, glede na nukleotidno zaporedje, specifični pomnožek (Valasek in Repa, 2005).

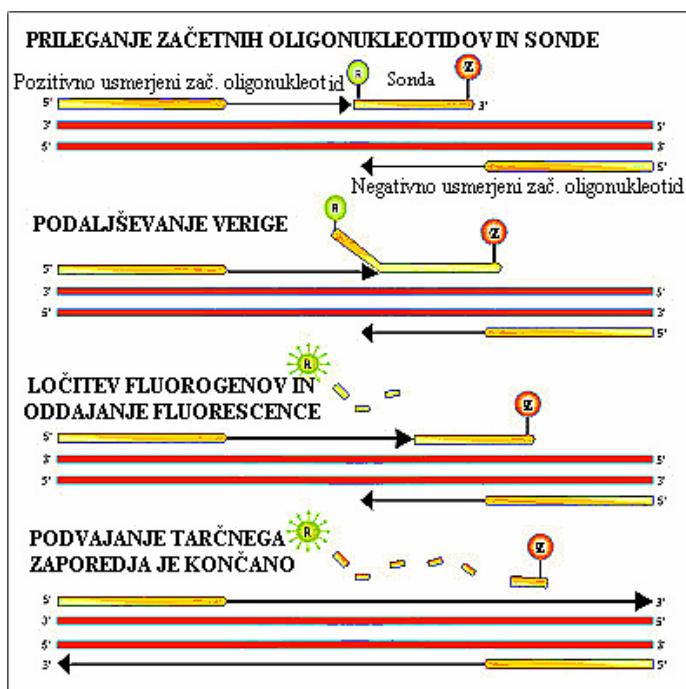
Pomnožek, ki ga dobimo z metodo PCR v realnem času, dokažemo na dva načina:

- Nespecifično dokazovanje z vezavo barvil v dsDNA. Barvila, kot je SYBR Green, se nespecifično vežejo v katero koli dvojno zvito molekulo DNA in ob osvetlitvi s svetlobo določene valovne dolžine emitirajo večjo fluorescenco kot prosta v mešanici. Večja kot je količina dsDNA v vzorcu, več barvila se veže in posledično je večji tudi nespecifični fluorescenčni signal (Valasek in Repa, 2005).

- Specifično dokazovanje pomnožkov temelji na prenosu fluorescenčne resonančne energije (FRET, angl. fluorescence resonance energy transfer) med reporterskim in zaviralnim fluorogenom, ki sta vezana na tretji oligonukleotid – sondo (Mackay in sod., 2002). Ko sta fluorogeni barvili v neposredni bližini oz. pripeti na sondi, zaviralni, ki je vezan na 3' koncu, absorbira svetlobni signal reporterskega, ki je vezan na 5' koncu, in ga odda v obliki toplotne. Med zaviralnimi fluorogeni so najbolj poznani TAMRA, DABCYL in BHQ, med reporterskimi pa FAM in VIC (Valasek in Repa, 2005).

Dobra fluorogena barvila so tista, ki se enostavno pripenjajo na DNA, jih je enostavno spremljati tudi ob nizkih koncentracijah in z enostavnimi instrumenti, so biološko varna, stabilna ob povišani temperaturi in ne ovirajo polimerazne aktivnosti (Mackay in sod., 2002).

Med najbolj uporavnimi so TaqMan oz. 5' nukleazne sonde, ki imajo na 5' koncu pritrjen fluorogen FAM, na 3' koncu pa TAMRA. Pri podvajjanju tarčnega dela DNA polimeraza s 5' nukleazno aktivnostjo (Taq polimeraza) razreže sondu in tako se fluorogena ločita (Slika 6). Reporterski fluorogen se oddalji, s čimer je prekinjen učinek dušenja in tako lahko izmerimo jakost fluorescence, ki se ujema s specifičnim pomnožkom DNA (Espy in sod., 2006).

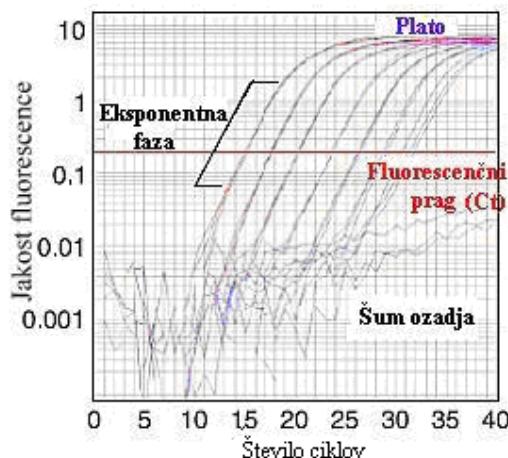


Slika 6: Princip delovanja PCR v realnem času s sondom TaqMan (R – reporterski fluorogen, Z – zaviralni fluorogen) (Applied Biosystems..., 2008).

Označene sonde se komplementarno vežejo na tarčno zaporedje. Med 5' nukleazno aktivnostjo DNA polimeraza sonda razgradi in jakost fluorescence naraste (Espy in sod., 2006). S pomočjo računalniškega programa lahko spremljamo naraščanje količine pomnožka v obliki sigmoidne krivulje (Mackay in sod., 2002). Slika 7 prikazuje povečanje v fluorescenci reporterskega fluorogena z vsakim PCR produktom, ki nastane z vsakim ciklom reakcije PCR (Valasek in Repa, 2005). Začetni pomnožki na Sliki 7 niso vidni, ker je fluorescenčni signal reporterskega fluorogena nerazločen od fluorescence ozadja. Pomnožek lahko dokažemo šele, ko fluorescensa pomnožka preseže prag detekcije. To točko oz. cikel imenujemo Ct (angl. threshold cycle). Eksponentnemu povečanju tarče in

signala sledi plato faza, v kateri začetni oligonukleotidi, sonde in encim postanejo omejujoči dejavnik, inhibitorji se akumulirajo, reakcija se upočasni in fluorescenčni signal se ne povečuje več (Mackay in sod., 2002). Zato začetne količine nukleinske kisline v vzorcu ne merimo na koncu reakcije, ampak v eksponentni fazи, ko so reakcijski pogoji optimalni (Valasek in Repa, 2005).

Vrednost Ct je obratnosorazmerna s količino specifične tarče v vzorcu, torej, višja kot je začetna količina tarčne DNA v vzorcu, nižji bo Ct, saj bo jakost fluorescence prej prešla prag detekcije. V popolnoma zmogljivem modelu PCR se količina pomnožka podvoji z vsakim ciklom (Valasek in Repa, 2005).



Slika 7: Krivulje pomnoževanja tarčnega dela nukleinske kisline z metodo PCR v realnem času (Valasek in Repa, 2005: 153).

Kontrole

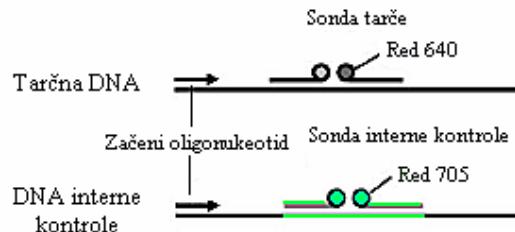
- Pozitivna kontrola; kot pozitivno kontrolo največkrat uporabimo vzorec, v katerem smo predhodno dokazali specifično tarčo. Z dodatkom pozitivne kontrole se prepričamo o uspešnem pomnoževanju izbrane tarče.
- Negativna kontrola; kot negativno kontrolo največkrat uporabimo vodo ali pufer. Najbolj optimalno bi bilo, da bi izbrali vzorec, ki ne vsebuje tarčne nukleinske kisline in tako ni specifičnega PCR pomnožka. Z dodajanjem negativne kontrole se tudi prepričamo, da reagenti niso kontaminirani s tarčno nukleinsko kislino.

- Interna (inhibitorna) kontrola

Klinični vzorci vsebujejo številne inhibitorje, ki lahko motijo osamitev in pomnoževanje DNA. Največ inhibitorjev vsebuje iztrebek in sputum, manj pa plazma in serum (Espy in sod., 2006). Da smo resnično prepričani v kakovost dobljenih rezultatov, v vsak vzorec pred pomnoževanjem ali pred osamitvijo dodamo nukleinsko kislino (interni kontrolo). Na ta način preverimo učinek osamitve (izguba nukleinske kisline) in pomnoževanja (inhibicija) (Niesters, 2004).

Ločimo dva tipa internih kontrol:

i) homologne kontrole – DNA interne kontrole ima enake robne sekvence kot tarča, na katere se vežejo začetni oligonukleotidi, a različno notranje zaporedje, na katero se komplementarno veže sonda. Tako dobimo dva različna fluorescenčna signala s FRET (Slika 8). Interno kontrolo dodamo v nižji koncentraciji, da ne bi prišlo do tekmovalnosti s ciljno tarčo.



Slika 8: Primer homologne interne kontrole (Espy in sod., 2006: 176).

ii) heterologne kontrole – DNA interne kontrole ni komplementarna tarčnemu zaporedju. Pomnoževanje temelji na skupini genov, za katere se pričakuje, da so prisotni v vsakem vzorcu (npr. β -globinski geni, bakteriofag λ ...), za kar potrebujemo dodaten par začetnih oligonukleotidov in sond. Pomnoževanje in spremljanje potekata individualno za tarčo in kontrolo (Espy in sod., 2006).

Uporaba internih kontrol precej poveča stroške metode, zato se nekateri laboratoriji poslužujejo uporabe alternativnih polimeraz (*Tfl*, *Pwo*, *Tth*...), ki so odporne proti nekaterim inhibitorjem (Espy in sod., 2006; Valasek in Repa, 2005).

Kljud odličnim rezultatom molekularnih metod pa se pri njihovi uporabi srečamo z nekaterimi ovirami. Metoda PCR npr. nič ne pove o subvirusnih komponentah, ki se lahko sintetizirajo kasneje v infekcijskem krogu virusa (npr. prazni virioni). Zaradi tega se pojavlja vprašanje, če njihova praktična občutljivost res presega občutljivost elektronske mikroskopije (Hazelton in Gelderblom, 2003). Problem predstavlja tudi standardizacija metod za viruse, ki so komercialno manj zanimivi (npr. Epstein-Barr virus, adenovirus, virus gripe...), in uporaba zgoraj navedenih kvalitativnih kontrol (Nieters, 2004). Cena PCR v realnem času je izredno visoka, navzkrižna reaktivnost začetnih oligonukleotidov pa lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov (Espy in sod., 2006).

2.3 OCENA SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI DIAGNOSTIČNIH TESTOV

Za diagnostične teste je zelo pomembno, da ločijo med osebami z okužbo in brez nje.

Občutljivost testa je definirana kot zmožnost testa, da pravilno identificira osebe z določeno okužbo in je rezultat testa pozitiven. *Specifičnost* testa pa izrazimo kot zmožnost testa, da pravilno identificira zdrave neokužene osebe in je rezultat testa negativen (Gordis, 2004).

Preglednica 2 prikazuje primerjavo rezultatov (rezultat je pozitiven ali negativen) rutinskih metod elektronske mikroskopije in testa ELISA z molekularno metodo PCR, ki velja kot zlati standard v molekularni virologiji (Mackay in sod., 2002).

Preglednica 2: Primerjava rezultatov testiranj rutinskih metod z molekularno metodo PCR v realnem času.

		Rezultati testiranj z molekularno metodo PCR v realnem času	
Rezultati rutinskih metod		POZITIVNI	NEGATIVNI
POZITIVNI	Resnično pozitivni (RP) = okužen in rezultat testa je pozitiven		Lažno pozitivni (LP) = neokužen, vendar rezultat testa je pozitiven
NEGATIVNI	Lažno negativni (LN) = okužen, vendar rezultat testa je negativen		Resnično negativni (RN) = neokužen in rezultat testa je negativen

$$OBČUTLJIVOST = \frac{RP}{RP + LN} \quad \dots(1)$$

$$SPECIFIČNOST = \frac{RN}{RN + LP} \quad \dots(2)$$

V idealnem primeru si želimo, da so vsi rezultati testa v zgornjem levem kvadratu in v spodnjem desnem kvadratu; osebe, ki so okužene in smo jih tudi s testom pravilno uvrstili med »pozitivne« (resnično pozitivni) in osebe, ki so zdrave in smo jih s testom pravilno uvrstili med »negativne« (resnično negativni). Vendar so takšni izidi testiranj redki.

Preiskovancem, ki smo jih s testom napačno označili kot pozitivne (lažno pozitivni) in osebam, ki so okužene, a smo jih s testom napačno identificirali kot negativne (lažno negativni), lahko to povzroči različne težave v smislu stigmatizacije z diagnozo ali pa v nasprotnem primeru z možnostjo prepoznega zdravljenja ali nehotenega širjenja okužbe (Gordis, 2004).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Klinični material

V raziskavo smo vključili 203 klinične vzorce, ki smo jih v času od 28.10.2008 do 27.12.2008 zaporedno prejeli na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Vzorce smo prejeli iz različnih zdravstvenih ustanov v Sloveniji. Vzorec je bil iztrebek bolnikov s simptomi virusnega gastroenteritisa. Iztrebke so naročniki preiskav poslali v redno laboratorijsko diagnostiko v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov.

Vzorec v laboratorij dostavijo v posodicah za transport v prenosnem hladilniku pri 4 °C. Iztrebkov ne zmrzujemo na -20 °C. Priprava iztrebka poteka tako, da v 1 ml redčitvenega pufra dodamo iztrebek, vorteksiramo in centrifugiramo 10 minut na 3200 obratih/minuto. Za negativno kontrastiranje elektronsko mikroskopskega preparata in za encimskoimunske reakcije uporabimo supernatant (vzorec), usedlino pa zavrzemo.

Za dokaz adenovirusov (vrste F, tip 40 in 41) v iztrebku bolnikov uporabljam elektronsko mikroskopijo in test ELISA. Omenjeni metodi bi naj glede na visoko koncentracijo izločanja virusov nudili zadovoljivo zanesljivost. Kombinirana uporaba obeh metod je pomembna, saj se v blatu izločajo tudi adenovirusi drugih vrst, ki pa po zaenkrat znanih podatkih nimajo jasne vloge pri gastroenteritisih. Zato so testi, ki ne ločijo vrste F od ostalih vrst adenovirusov lahko, neprimerni in zavajajoči (Wood in sod., 1989).

Podatke o vzorcih in rezultate diagnostike smo pridobili iz evidenčnega dnevnika laboratorija EMI in notranje računalniške baze podatkov.

3.1.2 Laboratorijska oprema in aparature

- brezprašna komora za osamitev nukleinske kisline in dodajanje DNA k reakcijski mešanici (LFV 91T, Iskra Pio)
- zaščitne rokavice (Duoshield)
- epruvetke (1,5 ml; Eppendorf, Hamburg, Nemčija)

- stojalo za epruvetke
- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- nastavki za pipete (Neptune)
- mešalo (Fisher Scientific, Leicestershire, Velika Britanija)
- termoblok (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- centrifuga 5415R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- 5% natrijev hipoklorid
- 70% etanol
- staničevina
- sistem za osamitev nukleinske kisline MagNA Pure Compact (Roche, Applied Science, Basel, Švica)
- brezprašna komora za pripravo reakcijske mešanice za PCR (LFV 9, Iskra Pio)
- reakcijska ploščica za PCR (MicroAmpTM, Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA)
- aparatura za pomnoževanje nukleinske kisline v realnem času StepOneTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA)
- avtomatska pipeta (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- nastavki za avtomatsko pipeto (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)

3.2 METODE DELA

3.2.1 Elektronska mikroskopija

Postopek elektronske mikroskopije, ki ga uporabljajo v laboratoriju EMI:

- Iztrebek razredčijo s pufrom, tresejo 15–30 sekund na mešalu. Po tresenju posodice ne odprejo takoj, saj se aerosol mora usesti.
- Centrifugirajo 5 minut pri 3200 obratih na minuto.

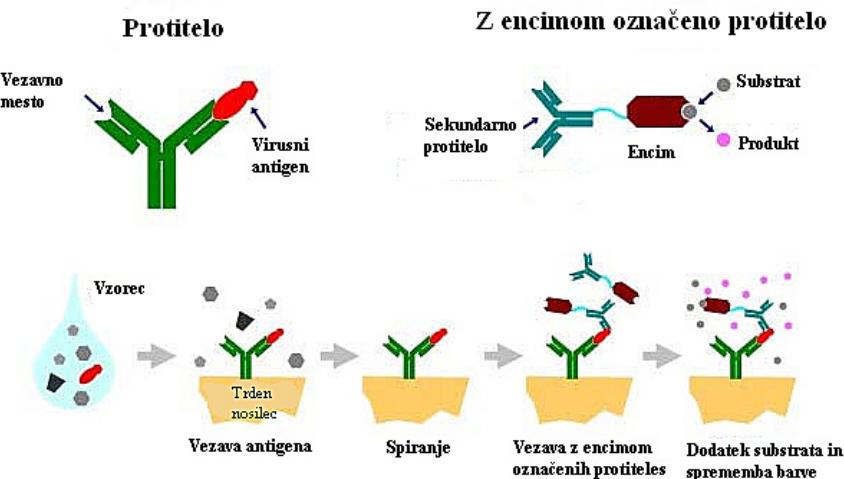
NEGATIVNO KONTRASTIRANJE

- Supernatant (vzorec) nakapljajo na parafilm.
- Mrežico s svetlečo stranjo položijo na kapljico vzorca in inkubirajo 1-5 minut.
- Po inkubaciji popivnajo vzorec z mrežico, jo sperejo na kaplji PBS (angl. *phosphate buffered saline*) in popivnajo.

- Mrežico položijo na kapljo kontrastnega sredstva in inkubirajo 1 minuto, popivnajo in nato posušijo na zraku.
- Mikroskopirajo.

3.2.2 Encimskoimunska metoda

Encimskoimunski test Primer™ Adenoclone®-Type 40/41 (Meridian Bioscience, Ohio, USA), ki ga uporabljajo v laboratoriju EMI za *in vitro* diagnostiko, temelji na sistemu dvojnih protiteles – t.i. »sendvič« ELISA. Monoklonska protitelesa, naravnana proti vrstno in tudi serotipsko specifičnemu antigenu (glavna jedrna beljakovina in polipeptid IX) so pritrjena na trden nosilec in ne vežejo nobenih drugih serotipov razen 40 in 41. Po dodatku bolnikovega iztrebka dodajo še druga monoklonska protitelesa, ki so označena z encimom peroksidazo in inkubirajo 60 minut pri sobni temperaturi. Po spiranju nespecifično vezanih virusov dodajo encimski substrat A (ureaperoksid) in substrat B (tetrametilbenzid) in ponovno inkubirajo 10 minut na sobni temperaturi (Slika 9).



Slika 9: »Sendvič« ELISA za dokazovanje virusnih antigenov (The future of things..., 2007).

Po delovanju encima dodajo »stop« raztopino in glede na spremembo barve spektrofotometrično izmerijo absorbanco pri valovni dolžini 450 nm. Istočasno naredijo tudi pozitivno (z neaktivnim Ad41) in negativno kontrolo, da preverijo, če test pravilno deluje. Kiveta s pozitivno kontrolo mora biti vidno modre barve. Negativna kontrola se ne sme vidno obarvati, absorbanca pa mora biti nižja od 0,15. Absorbanca 0,15 predstavlja

mejo, nad katero vzorec obravnavajo kot pozitiven, pod njo pa kot negativen. Proizvajalec zagotavlja, da je občutljivost in specifičnost testa 98%.

3.2.3 Osamitev celokupne nukleinske kisline iz vzorcev

Za osamitev celokupne nukleinske kisline iz vzorcev smo uporabili komercialni komplet MagNA Pure Compact Nucleid Acid Isolation Kit I (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija).

Vsebina kompleta:

- 32 kartuš z reagenti:
 - proteinaza K
 - lizirajoči pufer
 - spiralni pufer
 - elucijski pufer
 - steklene kroglice z vezanimi magnetki
- 32 plastičnih vložkov
- 35 epruvetk za vzorce
- 35 elucijskih epruvetk
- 35 pokrovčkov za elucijske epruvetke

Reagenti so stabilni na sobni temperaturi od 15 °C do 25 °C.

Vzorce, iz katerih smo v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (VIN) osamili celokupno nukleinsko kislino, smo prinesli iz zbirke vzorcev, ki jih v laboratoriju EMI hranijo pri -20 °C. V brezprašni komori za varno delo, ki smo jo predhodno očistili s 70% etanolom, smo vzorce najprej odmrznili in jih na mešalcu dobro premešali, da so postali homogeni. Nato smo v 1,5 ml epruvete pipetirali 5 µl interne kontrole (EHV1, angl. equine herpesvirus type 1) in 195 µl vzorca. Dodali smo še 180 µl lizirajočega pufra in 20 µl proteinaze K (Qiagen, GmbH, Hilden, Nemčija), ki povzročata razgradnjo celic in beljakovin (Kirchgesser in sod., 2003). Epruvete smo inkubirali 10 minut pri 65 °C v termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Inkubacijo smo podaljšali za 10 minut pri 95 °C. Po inkubaciji smo pripravljene vzorce na kratko centrifugirali v centrifugi 5415R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

V aparatu za osamitev nukleinske kisline MagNA Pure Compact (Roche, Applied Science, Basel, Švica) smo namestili vse potrebne kartuše z reagenti. Le-te smo pred uporabo dobro pretresli, saj se magnetni delci v kartuši morajo enakomerno porazdeliti. Z ustreznim programom smo izbrali želeni protokol osamitve, ki je odvisen od virusnega genoma, vrste kliničnega vzorca in kvalitete poslane kužnine. Ker smo DNA osamili iz iztrebkov, smo izbrali protokol »DNA blood external lysis«, količino vzorca 400 µl in volumen elucije 100 µl. Po končanem postopku smo elucijske epruvetke z DNA pokrili, jih ustrezno označili in shranili pri -20 °C.

3.2.4 PCR v realnem času za adenoviruse

3.2.4.1 Reagenti potrebni za izvedbo PCR v realnem času

Preglednica 3: Reakcijska mešanica za PCR; adenovirus vrsta F z interno kontrolo – virus EHV in BSA.

Reagenti	Količina (µl)	Končna koncentracija
AdF-F (50 µM)	0,15	300 nM
AdF-R (50 µM)	0,45	900 nM
AdF-P-FAM (50 µM)	0,25	200 nM
EHV-F1 (10 µM)	1	400 nM
EHV-R1 (10 µM)	1	400 nM
EHV-P-VIC (10 µM)	0,25	100 nM
TaqMan® Universal Master Mix	12,5	
BSA (20X)	1,25	1X
ddH ₂ O	2,15	
DNA	6	
Skupaj	25	

TaqMan® Universal PCR Master Mix

Za pripravo reakcijskih mešanic smo uporabili komercialni komplet reagentov TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA). Shranjevali smo ga pri temperaturi 2 – 8 °C.

Komercialni komplet je vseboval:

- DNA polimeraza (AmpliTaq Gold DNA polymerase) – termostabilna polimeraza, ki ima 5' proti 3' nukleazno aktivnost, nima pa 3' proti 5' eksonukelazne aktivnosti;
- uracil-N-glikozilaza (AmpErase UNG) – odstrani vse uracile, ki so vezani v enojni oz. dvojni vijačnici in na takšen način prepreči vnovično pomnoževanje PCR pomnožkov potem, ko je reakcija že končana;
- mešanica dNTP-jev z dUTP-ji;
- pasivno referenčno barvilo ROXTM (6-karboksi-*N,N,N',N'*-tetrametilrodamin), ki zmanjša vpliv nespecifične fluorescence vzorcev oz. ozadja (Di Trani in sod., 2006; Mackay in sod., 2002);
- pufer.

Začetni oligonukleotidi in sonde

Za vse reakcije pomnoževanja adenovirusne DNA smo uporabili enake reagente, a različne vrstnospecifične začetne oligonukleotide in sonde (Lion in sod., 2003). Izvedli smo 6 ločenih PCR reakcij za različno vrsto adenovirusa.

Preglednica 4: Reakcijske mešanice za PCR; količina in končna koncentracija začetnih oligonukleotidov in sond za določanje adenovirusov vrst A, B, C, D, E.

Reagenti	Količina (µl)	Končna koncentracija
AdA-F (50 µM)	0,15	300 nM
AdA-R (50 µM)	0,15	300 nM
AdA-P-FAM (20 µM)	0,25	200 nM
AdB-F (50 µM)	0,45	900 nM
AdB-R (50 µM)	0,45	900 nM
AdB-P-FAM (20 µM)	0,25	200 nM
AdC-F (50 µM)	0,15	300 nM
AdC-R (50 µM)	0,45	900 nM
AdC-P-FAM (20 µM)	0,25	200 nM
AdD-F (50 µM)	0,15	300 nM
AdD-R (50 µM)	0,025	50 nM
AdD-P-FAM (20 µM)	0,25	200 nM
AdE-F (50 µM)	0,45	900 nM
AdE-R (50 µM)	0,15	300 nM
AdE-P-FAM (20 µM)	0,25	200 nM

Pri reakciji PCR v realnem času smo uporabili začetne oligonukleotide (TIB MOLBIOL, Berlin, Nemčija), s katerimi smo pomnoževali regijo heksonskih genov in v primeru AdD, regijo VA RNA gena. Te regije vsebujejo zaporedja, ki so visoko ohranjena med serotipi (Echavarria; 2008).

Izbrali smo sonde, ki so na 5' koncu označene z reporterskim flurogenom FAMTM (karboksi-flurescein) in na 3' koncu z zaviralnim fluorogenom TAMRATM (karboksi-tetrametil-rodamin) (TIB MOLBIOL, Berlin, Nemčija).

Začetne oligonukleotide in sonde smo shranjevali pri temperaturi 4 °C.

Značilnosti začetnih oligonukleotidov in sond, ki smo jih uporabili, so navedene v Preglednici 5.

Preglednica 5: Vrstnospecifični začetni oligonukleotidi in sonde za adenovirus, ki smo jih uporabili pri metodi PCR v realnem času (Lion in sod., 2003: 1115). F – pozitivno usmerjeni začetni oligonukleotid (angl. Forward Primer), P – sonda (angl. Probe), R – negativno usmerjeni začetni oligonukleotid (angl. Reverse Primer), bp – bazni par, VA RNA – virusno pridružena RNA (angl. virus-associated RNA), Ad – adenovirus, AdB (B+E): navzkrižni reaktivnosti začetnega oligonukleotida za dokazovanje vrste AdB, ki prepozna tudi vrsto AdE.

Vrsta	Tarčni gen	Dolžina tarčnega odseka (bp)	Oligonukleotidno zaporedje 5'-3'	Položaj nukleotidov v genomu
AdA	hekson	135	F: GGK CTG GTG CAA TTC GCC P: CCA CGG ACA CCT ACT TCA CCC TGG G R: CAC GGG CAC AAA ACG CA	17818-17835 17840-17864 17936-17952
AdB (B+E)	hekson	138	F: CGC CGG ACA GGA TGC TT P: AGT CGG GGT CTG GTG CAG TTC GCC R: CTA CGG TCG GTG GTC AC	45-61 73-96 166-182
AdC	hekson	138	F: ACC TGG GCC AAA ACC TTC TC P: AAC TCC GCC CAC GCG CTA GA R: CGT CCA TGG GAT CCA CCT C	2884-2903 2910-2929 2940-2958
AdD	VA RNA	143	F: AAA AAC GAA AGC GGT TGA GC P: CCA ATA CCA CGT TAG TCG CGG CT R: CGG GTC GAG ACC GGA GT	2-21 104-126 128-144
AdE	hekson	75	F: CAA CAC CTA CTC GTA CAA AGT GCG P: CGC CCA CGG CCA CGG TGT R: TAG GTG CTG GCC ATG TCC A	225-248 251-268 281-299
AdF	hekson	128	F: GCA GGA CGC CTC GGA GTA P: TAC TTC AGC CTG GGG AAC AAG TTC AGA AA R: TGT CTG TGG TTA CAT CGT GGG T	268-285 329-357 374-395

Kontrole

Pri pomnoževanju nukleinskih kislin različnih vrst adenovirusa z metodo PCR v realnem času smo uporabili pozitivno kontrolo, negativno kontrolo in interno kontrolo.

Kot pozitivno kontrolo pri pomnoževanju posameznega tipa adenovirusa smo uporabili njegov pozitivni izolat. Le v primeru pomnoževanja DNA AdD nismo uporabili nobene pozitivne kontrole, saj pozitivnega izolata v laboratoriju nismo imeli.

Kot negativna kontrola nam je služila demineralizirana destilirana voda (Promega).

Internu kontrolo smo dodali v vzorec že pred osamitvijo. Ta se je nato čistila in pomnoževala skupaj z našo tarčo v isti reakciji. Začetne oligonukleotide in sodo, ki so specifični za našo internu kontrolo, smo dodali le, ko smo pomnoževali AdF vrsto adenovirusa. V kasnejših reakcijah pomnoževanja ostalih vrst adenovirusa interne kontrole več nismo pomnoževali, saj s tem verjetno ne bi dobili dodatnih uporabnih podatkov o prisotnosti inhibitorjev, bi pa znatno povečali stroške.

Kot interna kontrola nam je služil konjski herpesvirus 1 (EHV1) iz družine herpesvirusov in poddružine alfaherpesvirusov. Virus ima tako kot adenovirusi, linearno molekulo dsDNA (Drinovec; 2005). Začetne oligonukleotide in sondu smo izbrali na podlagi članka, ki opisuje določanje EHV1 s PCR v realnem času (Diallo in sod., 2005).

- **EHV1 F1:** 5'-CATGTCAACGCACTCCCA-3'
- **EHV1 R1:** 5'-GGGTCGGCGTTCTGT-3'
- **EHV1 SONDA:** CCCTACGCTGCTCC

Sonda je na 5' koncu označena z fluorogenom VIC in na 3' koncu z zaviralnim fluorogenom.

Tako smo pomnožili 63 baznih parov dolg tarčni odsek.

Goveji serumski albumin (BSA, angl. Bovine Serum Albumin)

BSA (Invitrogen) smo dodali v vsako reakcijsko mešanico, v kateri se interna kontrola ni pomnožila. Po dodatku smo vzorec z interno kontrolo še enkrat pomnožili z metodo PCR v realnem času.

Dodatek BSA je enostavna in učinkovita metoda, ki odstrani PCR inhibitorje (Oikarinen in sod., 2009).

Hranimo ga pri temperaturi -20 °C.

Pomnoževanje in temperaturni cikli

PCR v realnem času smo izvedli s sistemom StepOneTM Real-Time PCR (Applied Biosystem, Foster City, Kalifornija, ZDA). Vzorce smo z izbrano metodo testirali na posamezne vrste adenovirusa.

Adenovirusno nukleinsko kislino iz posameznega vzorca smo pomnoževali v 6 ločenih PCR reakcijah in glede na vrsto izbrali ustrezni par začetnih oligonukleotidov in sond. Vzorce, kateri so bili z EM in testom ELISA negativni, PCR reakcij, da bi dokazali prisotnost vrst AdA in AdD nismo naredili, saj jih v iztrebku nismo pričakovali.

Reakcijske mešanice smo pripravili v brezprašni komori za varno delo in pazili, da ni prišlo do kontaminacije.

Temperaturni pogoji se v sistemu zvezno spreminjajo v ponavljačih se ciklih. Aktivacija uracil-N-glikozilaze (AmpErase^{®UNG}) je potekala 2 minuti pri 50 °C. Temu je sledila aktivacija DNA polimeraze (AmpliTaq Gold DNA polymerase), in sicer 10 minut pri 95 °C. Nato je sledilo 50 PCR temperaturnih ciklov v dveh fazah:

- denaturacija dsDNA pri temperaturi 95 °C, 15 sekund
- prileganje začetnih oligonukleotidov in oligonukleotidne sonde ter podaljševanje DNA pri temperaturi 60 °C, 60 sekund.

Pomnoževanje tarčnih zaporedij smo spremljali med potekom encimske reakcije na zaslonu računalnika. Zabeležili smo vse pozitivne rezultate in njihove vrednosti Ct.

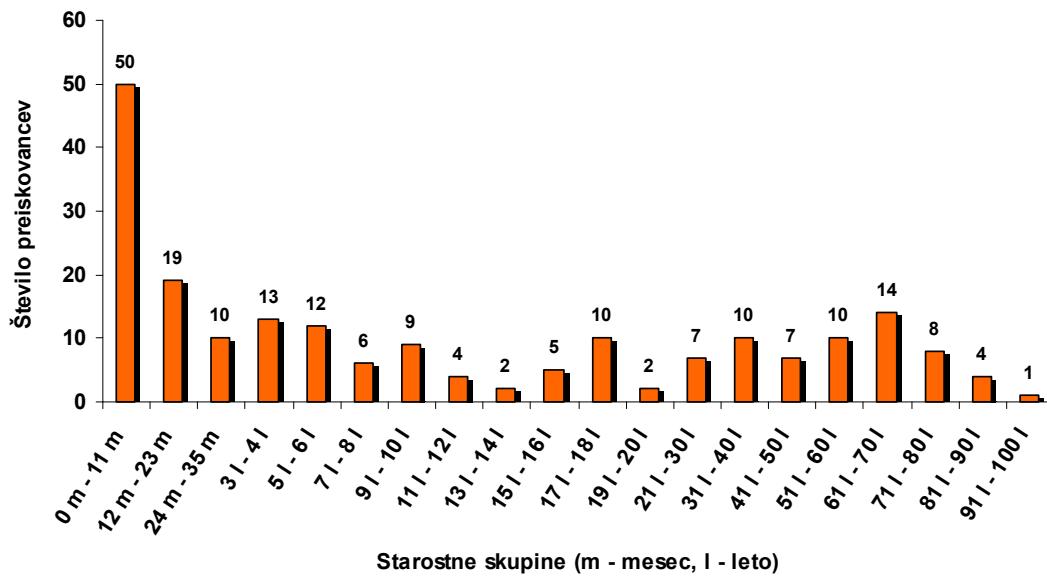
4 REZULTATI

4.1 REZULTATI PREJETIH VZORCEV

V raziskavo smo vključili 203 klinične vzorce. Vzorci so bili iztrebki bolnikov, ki so imeli simptome virusnega gastroenteritisa. Iztrebki so bili poslani v redno laboratorijsko diagnostiko v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov. Le-te so pregledali z ustaljenimi metodami (dokaz antigenov - samo za vrsto AdF in elektronska mikroskopija).

Od vseh vzorcev jih je 104 (51,2 %) pripadalo bolnikom ženskega spola in 99 (48,8 %) bolnikom moškega spola.

Kot je razvidno iz Slike 10, smo glede na starostno skupino imeli 50 (24,6 %) vzorcev bolnikov, ki so bili mlajši od enega leta. Skupno smo 92 (43,3 %) vzorcev dobili od bolnikov mlajših od 5 let in 111 (54,7 %) vzorcev od bolnikov, ki so bili starejši od 5 let. Najmlajši preiskovanec je imel 9 dni, najstarejši pa 97 let.



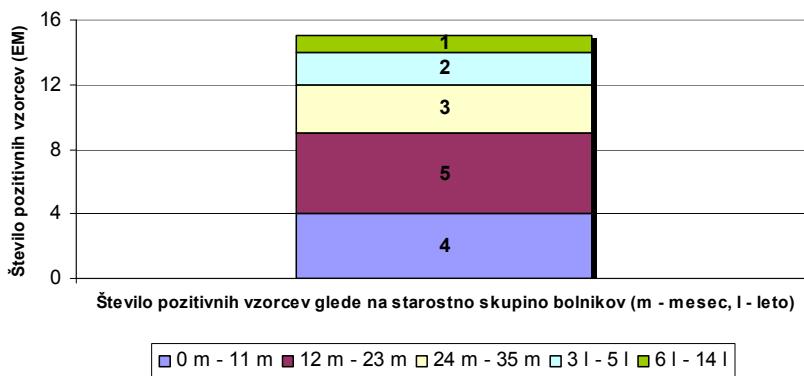
Slika 10: Starostna skupina bolnikov s simptomi virusnega gastroenteritisa, katerih iztrebki so bili poslani v Laboratorij za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov.

4.2 REZULTATI DOLOČANJA ADENOVIRUSNIH OKUŽB S TREMI METODAMI

Preglednica 6: Število in delež pozitivnih in negativnih vzorcev glede na adenovirusno okužbo, dokazanih s tremi različnimi metodami.

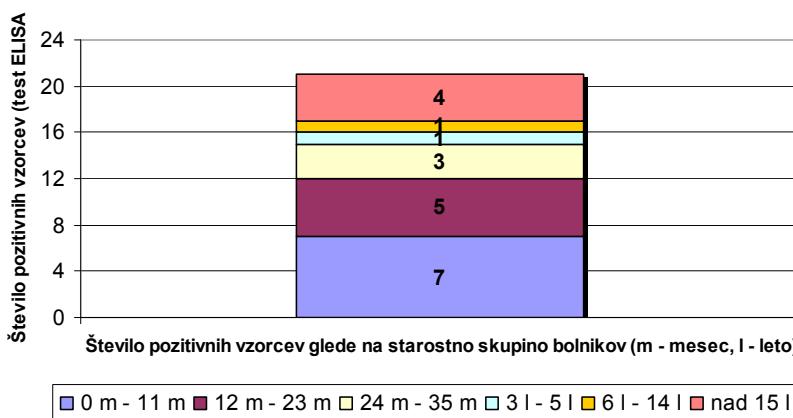
Metoda	POZ	NEG
Elektronska mikroskopija	15 (7,4 %)	188 (92,6 %)
ELISA	21 (10,3 %)	182 (89,7 %)
PCR v realnem času	32 (15,8 %)	171 (84,2 %)

Kot prikazuje Preglednica 6, so v redni diagnostiki virusnih gastroenteritičnih okužb z metodo elektronske mikroskopije od skupno 203 vzorcev okužbo z adenovirusi potrdili v 15 primerih, od teh je kar 12 vzorcev v skupini otrok mlajših od 3 let (Slika 11).



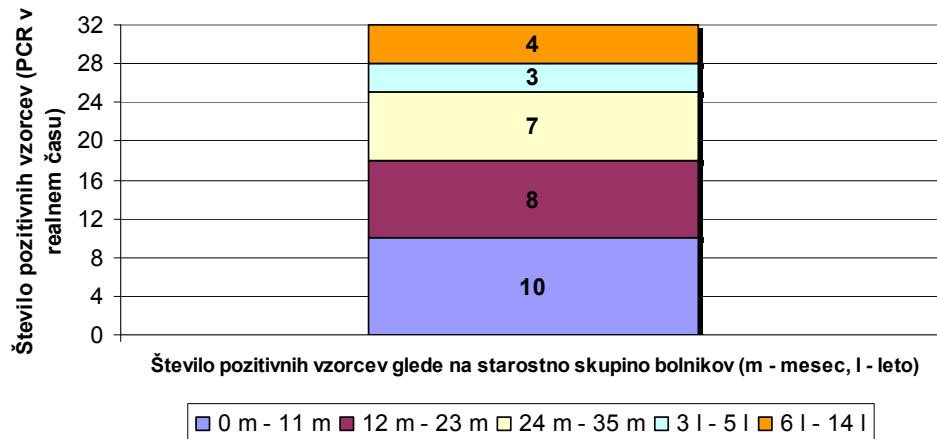
Slika 11: Število pozitivnih vzorcev na adenovirusno okužbo pri različni starostni skupini bolnikov, dokazanih z elektronsko mikroskopijo.

S testom ELISA, ki je specifičen samo za adenovirusno vrsto F, so potrdili 21 okužb in od tega v 15 primerih pri bolnikih mlajših od 3 let, kot prikazuje Slika 12.



Slika 12: Število pozitivnih vzorcev na adenovirusno okužbo pri različni starostni skupini bolnikov, dokazanih s testom ELISA.

Z izbrano molekularno metodo smo v vzorcih določevali vse znane adenovirusne vrste. Virusno DNA smo dokazali v 32 (15,8 %) vzorcih od vseh 203 testiranih. Največ pozitivnih rezultatov smo dokazali v skupini preiskovancev mlajših od 3 let in sicer 25, kar je 78,1 % vseh PCR pozitivnih vzorcev (Slika 13).



Slika 13: Število pozitivnih vzorcev na adenovirusno okužbo pri različni starostni skupini bolnikov, dokazanih z metodo PCR v realnem času.

4.3 REZULTATI TIPIZACIJE

Molekularna metoda PCR v realnem času omogoča določanje vseh znanih adenovirusnih vrst, zato smo v nekaterih vzorcih določili več kot eno vrsto.

Preglednica 7: Število in delež vzorcev, pri katerih smo določili eno ali več vrst adenovirusa.

PCR v realnem času	Skupaj	Delež
Pozitivni na 1 vrsto	15	46,9 %
Pozitivni na 2 vrsti	15	46,9 %
Pozitivni na 3 vrste	2	6,2 %
Vsi pozitivni vzorci	32	100,0 %

Virusno DNA smo dokazali v 32 od vseh 203 testiranih vzorcev. Pri 15-ih (46,9 %) preiskovancih smo potrdili okužbo z eno vrsto adenovirusa, pri 15 (46,9 %) vzorcih smo določili dve adenovirusni vrsti, dva (6,2 %) vzorca pa sta bila pozitivna na tri vrste.

Število pozitivnih vzorcev pri posamezni vrsti adenovirusa, ki smo jih določili z metodo PCR v realnem času, je različno.

Preglednica 8: Število in delež pozitivnih vzorcev pri posamezni vrsti adenovirusa.

Z metodo PCR v realnem času pozitivni vzorci (32)	Število	Delež
AdA	0	0 %
AdB	1	3,1 %
AdC	18	56,3 %
AdD	0	0 %
AdE	17	53,1 %
AdF	15	46,9 %

Kot prikazuje Preglednica 8, pri nobenem preiskovancu nismo našli vrste A in D. Le v enem vzorcu je bila prisotna vrsta B. Več kot polovica vseh PCR v realnem času pozitivnih vzorcev je vsebovala nukleinsko kislino adenovirusa C (56,3 %), 53,1 % jih je bilo AdE pozitivnih in 46,9 % AdF pozitivnih.

Kot je razvidno iz Preglednice 9, smo poleg okužb z eno vrsto pri preiskovancih dokazali tudi okužbe z dvema oz. tremi vrstami adenovirusa hkrati. Hkratnih okužb je skupaj bilo 17.

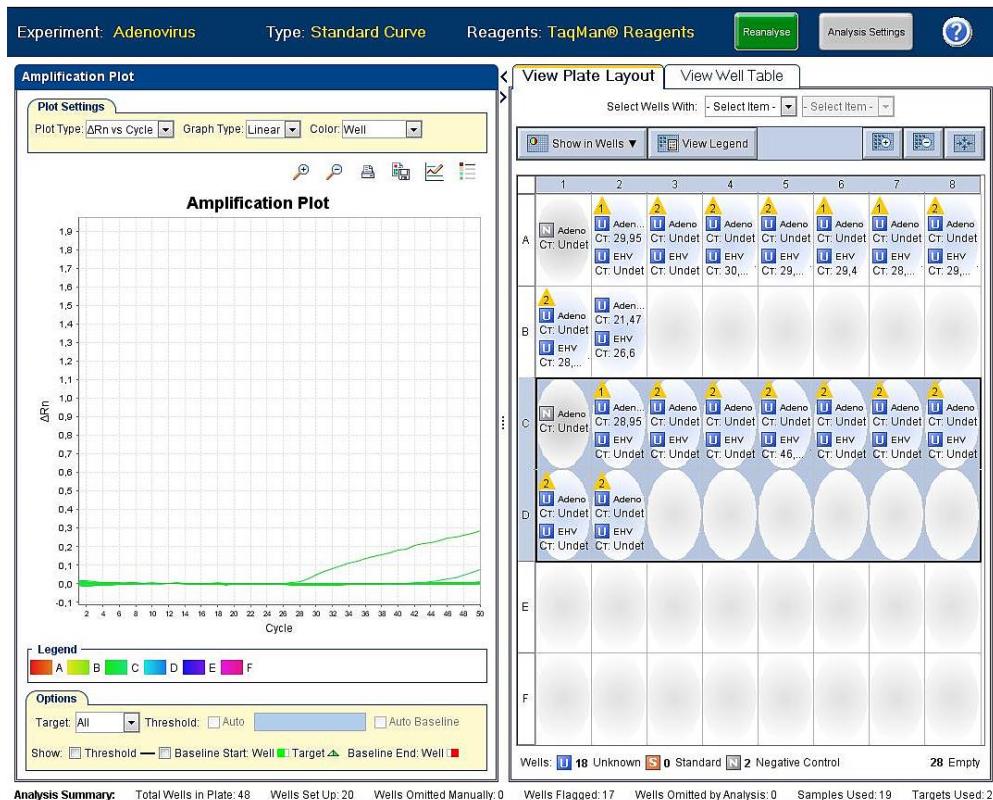
Preglednica 9: Število pozitivnih vzorcev na prisotnost različnih vrst adenovirusa hkrati.

Adenovirusna vrsta	Število
AdE+AdF	13
AdE+AdC	2
AdE+AdC+AdF	2
Vsota	17

Adenovirusna vrsta E ni bila nikoli edina dokazana vrsta, ampak je bila v 13 vzorcih dokazana skupaj z adenovirusom vrste F, v dveh vzorcih z adenovirusom vrste C in v dveh primerih s C in F hkrati. Enterični adenovirus vrste F smo v vseh primerih dokazali skupaj z vrsto E. Vrsto C smo kot edino v vzorcu dokazali v 14 primerih. Adenovirus vrste B nismo dokazali v hkratni okužbi s katero drugo vrsto adenovirusa.

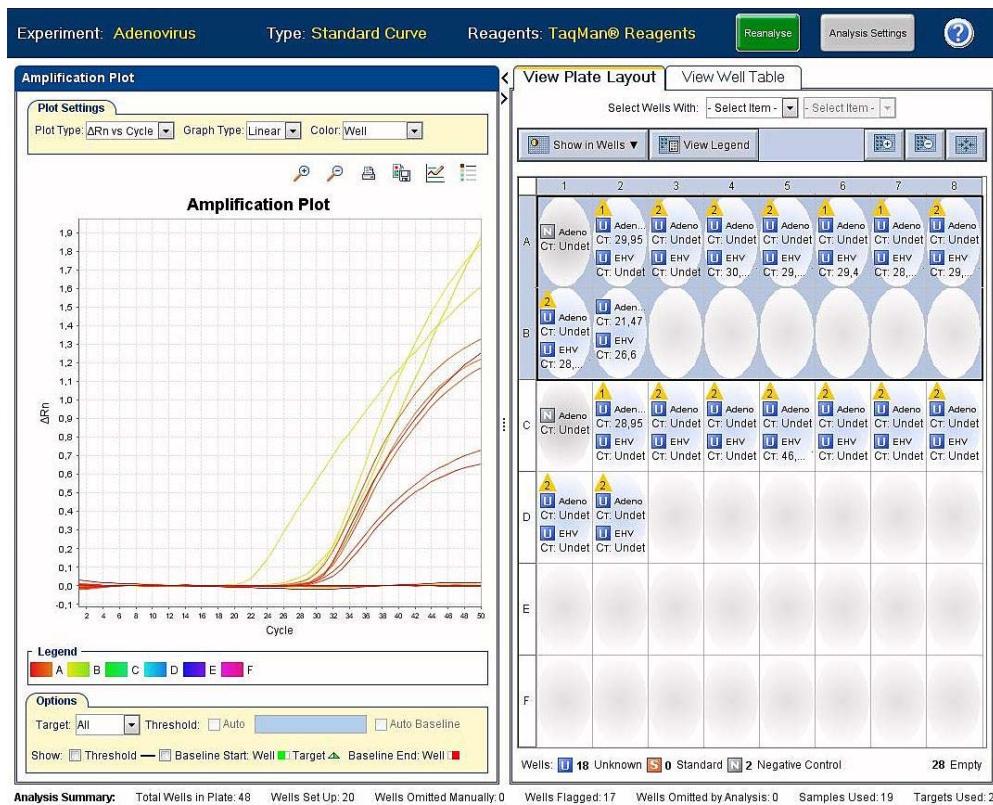
4.3.1 Rezultati internih kontrol

Slika 14 prikazuje rezultat reakcije, kjer v reakcijsko mešanico nismo dodali albumina. Iz krivulj, ki jih izriše računalniški program aparature za PCR v realnem času, lahko razberemo zelo visok Ct oz. v večini primerov pomnožkov sploh ni zaznati.



Slika 14: Izris krivulj računalniškega programa aparature za PCR v realnem času za vzorce, pri katerih v reakcijsko mešanico nismo dodali BSA.

Kot prikazuje Slika 15, smo po dodatku albumina v iste vzorce zaznali pomnoževanje internih kontrol brez vpilva inhibicije. Še več, v vzorcu(ih) smo potrdili tudi okužbo z adenovirusno vrsto F. Ta preiskovanec bi v primeru, če ne bi dodali BSA, ostal v skupini »lažno negativnih«.



Slika 15: Izris krivulj računalniškega programa aparature za PCR v realnem času za vzorce, pri katerih smo v reakcijsko mešanicu dodali BSA.

Preglednica 10 prikazuje, da je bil delež popolne inhibicije 15,8%, kar pomeni, da se v 32 vzorcih od 203 dodana interna kontrola ni pomnožila.

Preglednica 10: Delež popolne inhibicije vzorcev glede na dodano interno kontrolo, pred in po dodatku BSA.

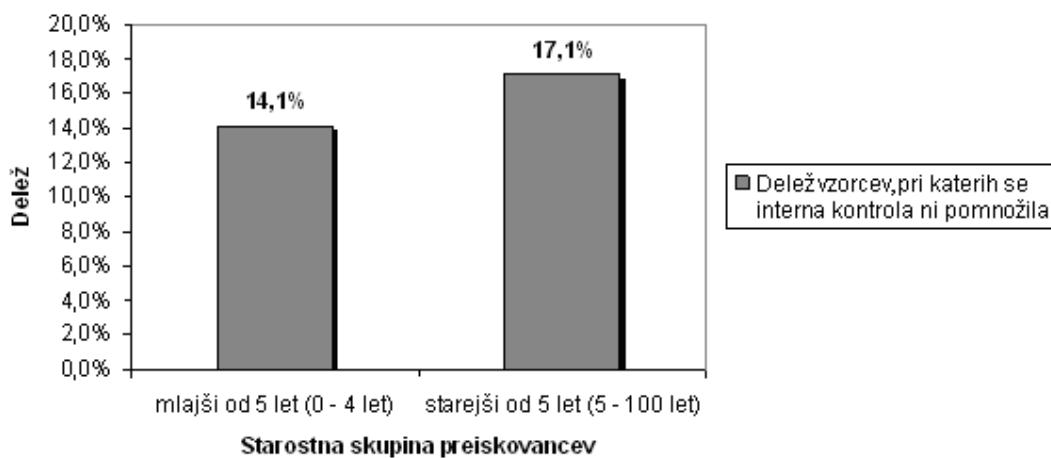
Interna kontrola	Skupaj	Po dodatku BSA	Dejanska popolna inhibicija
Negativna	32/203	6	3*
Delež inhibicije	15,8%		1,5%

* Dejansko popolno inhibicijo smo po dodatu BSA ugotovili le v 3 (1,5 %) vzorcih, saj smo v ostalih 3 primerih kljub ne-pomnoževanju interne kontrole dokazali adenovirusno DNA vrste E in F.

Po dodatu BSA se je delež inhibicije zmanjšal, kljub temu se interna kontrola ni pomnožila v 6 primerih. Z uporabo BSA smo odpravili večino inhibicij, ostale so le 3, kar je 1,5 % vseh 203 testiranih vzorcev.

Glede na starostno populacijo je bil delež inhibicij večji v skupini preiskovancev, ki so bili stari več kot 5 let. V tej skupini smo zaznali 19 (17,1 %) vzorcev z inhibicijo od 111 testiranih. V starostni skupini otrok mlajših od 5 let smo inhibicijo pomnoževanja virusne nukleinske kislina opazili v 13 (14,1 %) vzorcih od vseh 92 testiranih.

Inhibicije pomnoževanja virusne nukleinske kislina interne kontrole nismo opazili pri nobenem vzorcu preiskovanca, ki je bil mlajši od 10 mesecev.



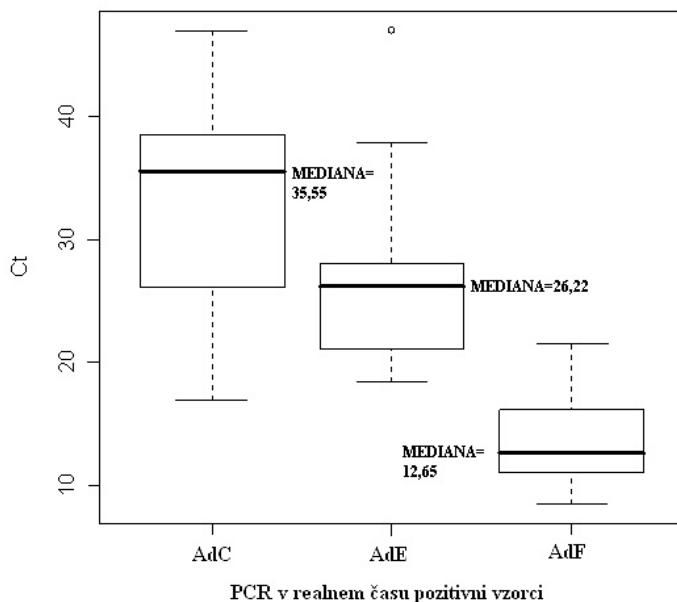
Slika 16: Dedež vzorcev, pri katerih se dodana interna kontrola ni pomnožila glede na starostno skupino preiskovancev.

4.3.2 Vrednosti Ct

Vrednost Ct smo določili pri vsakem vzorcu, v katerem se je virusna nukleinska kislina DNA z metodo PCR v realnem času uspešno pomnožila. Vrednost Ct je merilo za relativno količino tarčne DNA.

Slika 17 prikazuje okvirje z ročaji za vrednost Ct. Podatki, ki smo jih obravnavali, so vsi pozitivni vzorci metode PCR v realnem času adenovirusov vrste F, E in C. Najnižje vrednosti Ct smo opazili pri enterični vrsti adenovirusov F, kjer smo izračunali mediano 12,65, najvišje vrednosti Ct pa pri vrsti AdC z visoko vrednostjo mediane Ct 35,55. Mediana pri AdE je znašala 26,22.

Glede na vrednosti kvartilov lahko zaključimo, da je kar 25 % vseh AdF pozitivnih vzorcev z vrednostjo Ct manjšo od 11,07 in 75 % vseh vzorcev z vrednostjo Ct manjšo od 16,13. Meje prvih kvartilov glede na vrednost Ct so za AdE 21,03, za AdC pa 26,41.



Slika 17: Okvirji z ročaji za vrednost Ct vrste adenovirusov C, E in F. Slika prikazujejo mediano, kvartile, največjo in najmanjšo vrednost Ct ter osamelec.

Na podlagi rezultatov lahko sklenemo, da so bile vrednosti Ct najnižje pri dokazu adenovirusne vrste AdF in najvišje pri dokazu vrste AdC.

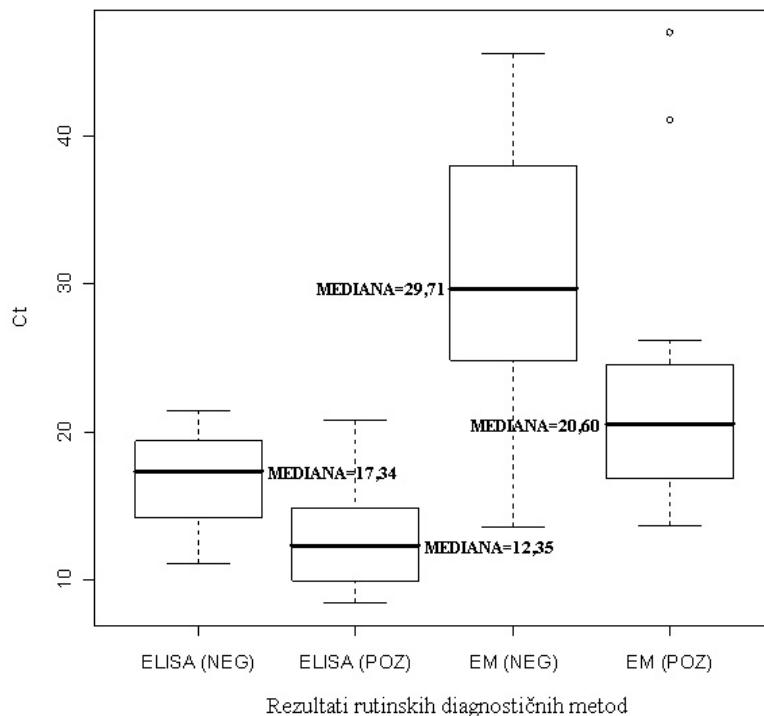
4.3.2.1 Primerjava vrednosti Ct vzorcev glede na elektronsko mikroskopijo in test ELISA

Kot prikazuje Slika 18, so bile vrednosti Ct značilno višje pri vzorcih preiskovancev, kjer z rutinskimi metodami (ELISA in EM) niso dokazali virusa ali virusnih antigenov, ampak smo virus dokazali samo z metodo PCR v realnem času.

Pri vzorcih, kjer so z elektronsko mikroskopijo dokazali morfološke značilnosti adenovirusa in adenovirusno DNA s PCR v realnem času, je mediana za vrednost Ct znašala 20,60; pri vzorcih z dokazano adenovirusno DNA z molekularno metodo in negativno elektronsko mikroskopijo pa 29,71. Pri 25 % vzorcev, pri katerih smo adenovirusno okužbo dokazali z obema metodama, je bil Ct nižji od 16,90, tisti vzorci, ki smo jih dokazali le z PCR v realnem času, pa so imeli Ct nižji od 24,86.

V redni diagnostiki s testom ELISA, ki je namenjen le za dokazovanje adenovirusov vrste F, je mediana za vrednost Ct pri vzorcih, ki so bili resnično pozitivni, znašala 12,35. Med

vzorci, pri katerih smo okužbo (z AdF) potrdili le z molekularno metodo, pa je bila mediana za Ct višja in sicer 17,34. Pri 25 % vzorcev, pri katerih smo adenovirusno okužbo dokazali z obema metodama, je bil Ct nižji od 10,49, tisti vzorci, ki smo jih dokazali le s PCR v realnem času, pa so imeli Ct nižji od 14,24.



Slika 18: Okvirji z ročaji za vrednosti Ct glede na rezultate rutinskih diagnostičnih metod – elektronske mikroskopije in testa ELISA.

4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV ELEKTRONSKIE MIKROSKOPIJE IN TESTA ELISA

Preglednica 11: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev na okužbo z adenovirusi vrste AdF s testom ELISA in elektronsko mikroskopijo.

	Rezultati elektronske mikroskopije		
	Pozitivni	Negativni	Skupaj
Rezultati testa ELISA			
Pozitivni	11	10	21
Negativni	4	178	182
Skupaj	15	188	203

Kot prikazuje Preglednica 11, so s testom ELISA, ki je specifičen za adenovirusno vrsto F in metodo elektronske mikroskopije, s katero dokazujojo morfološke značilnosti (katere koli vrste) adenovirusov, okužbo potrdili v 11 vzorcih. V 10 primerih so rezultati serološke metode bili pozitivni, pod mikroskopom pa adenovirusa niso našli. Pri 4 vzorcih je elektronska mikroskopija podala pozitiven rezultat, test ELISA pa negativnega.

4.5 IZRAČUN SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI METOD

4.5.1 Elektronska mikroskopija (EM)

Preglednica 12: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev na okužbo z adenovirusi z metodo PCR v realnem času in elektronsko mikroskopijo.

	Rezultati PCR v realnem času		
	Pozitivni	Negativni	Skupaj
Rezultati elektronske mikroskopije			
Pozitivni	15	0	15
Negativni	17	171	188
Skupaj	32	171	203

Občutljivost

Od 32 vzorcev, pri katerih smo z molekularno metodo dokazali adenovirusno nukleinsko kislino, jih je bilo z EM pravilno identificiranih kot »pozitivni« 15. 17 vzorcev je z EM bilo zgrešenih.

$$\text{Občutljivost} = \frac{15}{32} \cdot 100 = 46,9 \%$$

Občutljivost elektronske mikroskopije, ki je definirana kot zmožnost metode, da pravilno identificira osebe z adenovirusno okužbo in kjer je tudi rezultat pozitiven, je torej bila 46,9%.

Specifičnost

Od 171 vzorcev, pri katerih nismo dokazali adenovirusne nukleinske kisline, jih je bilo z EM pravilno identificiranih kot »negativni« vseh 171. Pravilna identifikacija ni bila zgrešena v nobenem vzorcu.

$$\text{Specifičnost} = \frac{171}{171} \cdot 100 = 100 \%$$

Specifičnost elektronske mikroskopije, ki je definirana kot zmožnost metode, da pravilno identificira neokužene osebe in kjer je tudi rezultat metode negativen, je torej bila 100%.

Lažno negativnih rezultatov je bilo 17, lažno pozitivnih rezultatov pa ni bilo. Od teh 17-tih zgrešenih preiskovancev je bilo 14 otrok, ki so bili mlajših od 33 mesecev, ostali trije so bili starejši od 5 let.

4.5.2 ELISA test

Preglednica 13: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev na okužbo z adenovirusi vrste AdF z metodo PCR v realnem času in testom ELISA.

	Rezultati PCR v realnem času		
	Pozitivni	Negativni	Skupaj
Rezultati testa ELISA			
Pozitivni	12	9	21
Negativni	3	179	182
Skupaj	15	188	203

Občutljivost

Od 15 vzorcev, pri katerih smo z molekularno metodo dokazali adenovirusno nukleinsko kislino enterične vrste F, jih je bilo s testom ELISA pravilno identificiranih kot »pozitivni« 12. Trije vzorci so bili s testom ELISA zgrešeni.

$$\text{Občutljivost} = \frac{12}{15} \cdot 100 = 80 \%$$

Občutljivost metode ELISA, ki je definirana kot zmožnost metode, da pravilno identificira osebe z enterično adenovirusno okužbo in kjer je tudi rezultat testa pozitiven, je bila 80%.

Specifičnost

Od 188 vzorcev, pri katerih nismo dokazali adenovirusne nukleinske kisline enterične vrste F, jih je bilo s testom ELISA pravilno identificiranih kot »negativni« 179. Devet vzorcev je bilo s testom ELISA zgrešenih.

$$\text{Specifičnost} = \frac{179}{188} \cdot 100 = 95,2 \%$$

Specifičnost testa ELISA, ki je definirana kot zmožnost metode, da pravilno identificira neokužene osebe in kjer je tudi rezultat testa negativen, je torej bila 95,2%.

Lažno negativni rezultati so bili trije, lažno pozitivnih rezultatov pa 9. Za teh 9 vzorcev smo poiskali tudi njihove vrednosti absorbance in preverili, kako blizu mejne vrednosti oz. točke detekcije so (cut off = 0,150).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Adenovirusne okužbe črevesja

Enterični adenovirusi (AdF) so za rotavirusi najpomembnejši povzročitelj virusnega gastroenteritisa po vsem svetu. Adenovirusne in rotavirusne okužbe so pogostejše pri otrocih mlajših od dveh let, pojavljajo pa se tudi pri bolnikih po transplantaciji kostnega mozga in pri ljudeh z imunsko pomanjkljivostjo (Logan in sod., 2006; Ebner in sod., 2005).

Tradicionalne metode določevanja adenovirusnih okužb, kot so gojenje v celičnih kulturah, elektronska mikroskopija in encimskoimunski test, se kljub številnim omejitvam še zmeraj uporabljajo (Ebner in sod., 2005).

V zadnjih letih je v porastu uporaba molekularnih metod, ki so hitre in veljajo za najbolj specifične in občutljive. Visoki stroški uporabe teh metod so glavna ovira pri uveljavljanju v rutinske diagnostične laboratorije. Zelo uporabne so pri diagnostiki okužb pri bolnikih po transplantacijah in z oslabljenim imunskega odzivom, saj je sistemski okužba z virusi pri teh osebah pogosto smrtna (Ebner in sod., 2005).

Namen diplomskega dela, je bil preizkusiti molekularno metodo PCR v realnem času za dokazovanje adenovirusne DNA v kliničnih vzorcih - iztrebkih bolnikov s simptomi virusnega gastroenteritisa. Rezultate smo primerjali s tistimi, ki so jih dobili z ustaljenima metodama ELISA in elektronska mikroskopija v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov. Uporabili smo tudi interno kontrolo, ki nam je bila v pomoč pri ugotavljanju inhibicij reakcije PCR v realnem času.

V kliničnih vzorcih, odvzetih v času med 28.10.2008 in 27.12.2008, smo dokazovali nukleinsko kislino različnih vrst adenovirusov. V ta namen smo pomnoževali ohranjene gene za heksone in v primeru določanja adenovirusa vrste D, gene za pridruženo virusno RNA (VA RNA).

V raziskavo smo vključili 203 vzorce. 92 (43,3 %) vzorcev smo prejeli od bolnikov, ki so bili mlajši od 5 let, od tega jih je 50 bilo mlajših od enega leta. Preostalih 111 (54,7 %) vzorcev smo prejeli od bolnikov starih 5 let in več. Tako smo med seboj primerjali dve starostni skupini bolnikov, pri čemer smo predvidevali, da bo v skupini otrok mlajših od tretjega leta največ pozitivnih vzorcev. Adenovirusni gastroenteritis je namreč najpogosteji v zgodnjem otroštvu, pri otrocih mlajših od dveh let, čeprav se okužbe pojavljajo tudi pri starejših otrocih in odraslih, a pri slednjih redkeje (Bányai in sod., 2009; Logan in sod., 2006).

Rezultate vzorcev, ki so jih dobili v redni laboratorijski diagnostiki z elektronsko mikroskopijo in testom ELISA, smo primerjali z molekularno metodo PCR v realnem času. Z elektronsko mikroskopijo so adenovirusno okužbo potrdili v 7,4 % od vseh 203 testiranih vzorcev, s testom ELISA, ki je specifičen samo za adenovirusno vrsto AdF, pa v 10,3 %. Z molekularno metodo smo potrdili 15,8 % okužb, kar je 53 % več pozitivnih vzorcev v primerjavi z metodo elektronske mikroskopije. V sorodnih raziskavah poročajo, da molekularne tehnike v primerjavi z elektronsko mikroskopijo tudi do 155 % povečajo število pozitivnih vzorcev, v katerih je povzročitelj gastroenteritisa (Logan in sod., 2006). Tako smo potrdili naša pričakovanja, da so molekularne metode bolj občutljive od komercialnih metod, ki ne zahtevajo drage opreme in pretirane spretnosti, a so slednje kljub nižji občutljivosti široko uporabne v diagnostičnih laboratorijih.

Rezultate, ki smo jih dobili z navedenimi metodami, smo primerjali tudi glede na starostno skupino in pri tem ugotovili, da je večina pozitivnih vzorcev pri otrocih starih manj kot tri leta. To nakazuje na to, da za adenovirusnim gastroenteritisom najpogosteje zbolevajo otroci. Poleg tega se virusi v iztrebku izločajo v visokih koncentracijah, kar je za določevanje virusnih okužb z elektronsko mikroskopijo zelo pomembno, saj zahteva vsaj 10^6 nepoškodovanih virusnih delcev na ml kužnine (Logan in sod., 2006). S PCR v realnem času smo dokazali 25 adenovirusnih okužb v skupini preiskovancev mlajših od treh let, kar je 78,1 % od vseh 32 s PCR v realnem času potrjenih okužb.

Molekularna metoda PCR v realnem času omogoča določanje vseh znanih adenovirusnih vrst. Od vseh 203 pregledanih vzorcev smo virusno nukleinsko kislino dokazali v 32 primerih. V vzorcih iztrebka smo določili, da je bila najbolj prevalentna vrsta C (56,3 %),

sledita ji vrsta E (53,1 %) in vrsta F (46,9 %). Le v enem vzorcu smo dokazali vrsto B (3,1 %), vrst A in D pa nismo dokazali.

Poleg 15 (46,9 %) enojnih okužb smo dokazali 17 (53,1 %) hkratnih okužb, od tega 2 hkratni okužbi s tremi tipi adenovirusov. Med enojnimi okužbami je prevladovala vrsta C, ki smo jo dokazali v 14 vzorcih, vrsto B pa le v enem primeru. Hkratnih okužb E/F je bilo 13, E/C dve in dve E/C/F hkratni okužbi. Znano je, da se nekateri serotipi vrst AdA, AdB, AdC lahko razmnožujejo v črevesju brez povzročitve gastroenteritisa in se kasneje po okužbi v določenih presledkih izločajo s fecesom (Haramoto in sod., 2007; Filho in sod., 2007).

Nekoliko drugačne rezultate od naših je podala raziskava, ki so jo opravili pri otrocih mlajših od 5 let v Rio de Janeiru in Salvadorju. Vse vzorce, ki so jih z encimskoimunskim testom določili kot pozitivne, so kasneje analizirali tudi s PCR. Nukleinsko kislino AdF so dokazali v 65 % vzorcev, AdA v 12 %, AdC in AdD v 5 %, ter AdB v 2 % (Filho in sod., 2007).

Poleg visokih stroškov uporabe PCR v virusni diagnostiki je ena izmed pomembnih omejitev metode tudi pojavljanje lažno negativnih rezultatov zaradi PCR inhibitorjev. Ti so pogosto v kliničnih vzorcih, kot je feces (Oikarinen in sod., 2009). Za ugotavljanje inhibicij PCR smo uporabili interno kontrolo EHV1, ki smo jo dodali v vzorec že pred osamitvijo DNA in tako preverili učinkovitost osamitve (morebitna izguba nukleinske kisline) in pomnoževanja (inhibicija pomnoževanja) (Nieters, 2004). Delež inhibicije je bil 15,8 % (32/203), kar je primerljivo z raziskavo Oikarinen S. in sodelavcev (2009), kjer je bila popolna inhibicija 12% (13/108). V vzorce, kjer smo ugotovili inhibicijo, smo dodali BSA, ki inaktivira inhibitorje, in nukleinsko kislino še enkrat pomnoževali z metodo PCR v realnem času. Tako smo zmanjšali delež inhibicije in interna kontrola se ni pomnožila v šestih vzorcih od skupno 203. Ker je bila interna kontrola, ki smo jo dodali, homologna tarčni adenovirusni DNA, je prišlo do tekmovalnosti med tarčno DNA in interno kontrolo za iste začetne oligonukleotide. V primeru, da se ni pomnožila niti interna kontrola niti tarča, je prišlo do inhibicije in rezultati metode niso bili veljavni. Če se je pomnožila tarčna DNA, interna kontrola pa ne, čeprav je bila dodana, potem smo privzeli, da je tarčna DNA v vzorcu v zelo veliki količini. V tem primeru lahko govorimo o delni inhibiciji; interna kontrola ni bila sposobna tekmovati za začetne oligonukleotide ali pa je

signal interne kontrole bil šibek oz. ga sploh ni bilo. Pozitiven rezultat je bil veljaven, kajti tarča se je pomnožila, rezultat pomnožka interne kontrole pa v tem primeru ni pomemben (Espy in sod., 2006). Tako smo po dodatku BSA dokazali le tri vzorce, pri katerih smo zaznali popolno inhibicijo, v treh primerih pa se je tarča pomnožila (Ct -ji: 8,49; 8,97; 11,97). Tako dejanska popolna inhibicija predstavlja le 1,5 % (3/203) vseh vzorcev.

Frekvenca PCR inhibitorjev naj bi bila višja pri odraslih osebah. To so ugotovili tudi v finski raziskavi, kjer niso zabeležili nobene inhibicije v fecesu bolnikov mlajših od 6 mesecev. Natančni razlogi, zakaj je temu tako, še niso znani in potrebne bodo nadaljnje raziskave (Oikarinen in sod., 2009). Tudi v naši raziskavi smo prišli do podobnih ugotovitev. Pri nobenem preiskovancu, ki je bil mlajši od 10 mesecev, nismo opazili inhibicije pomnoževanja interne kontrole.

Poleg interne kontrole smo pri našem delu uporabljali tudi pozitivno in negativno kontrolo pomnoževanja nukleinske kisline, kot ju zahteva vsak PCR protokol. Negativna kontrola – demineralizirana in destilirana voda je ostala v vseh reakcijah negativna, kar pomeni, da ni prišlo do kontaminacije vzorcev. Z uporabo pozitivne kontrole smo se prepričali, da je pomnoževanje vedno uspešno potekalo. Kot pozitivne kontrole smo uporabili pozitivne izolate posameznega tipa adenovirusa.

Za komercialno manj zanimive virusne obstaja težava glede poenotenega molekularnega dokazovanja teh virusov v diagnostičnih laboratorijih. Standardizirane metode so rezervirane samo za majhno število tarč (HIV tip 1, HBV, HCV). To je prav tako ena izmed težav pri uvajanju molekularnih metod v rutinsko diagnostiko (Niesters, 2004).

Vrednost Ct smo določili pri vsakem vzorcu, pri katerem se je adenovirusna nukleinska kislina pomnožila. Nizka vrednost Ct nakazuje na visoko začetno količino tarčne nukleinske kisline v vzorcu in obratno (Mackay in sod., 2002). Pričakovali smo, da bodo vrednosti Ct najnižje pri vzorcih, kjer bomo določili enterično vrsto F, saj poročajo, da je ta vrsta (serotipa 40 in 41) v 5-20 % povezana z akutnim virusnim gastroenteritisom pri dojenčkih in mlajših otrocih (Haramoto in sod., 2007). Mediana vrednosti Ct nam pove, da ima polovica vzorcev Ct nad to vrednostjo, polovica pa Ct pod vrednostjo mediane. Prav tako smo pri tej vrsti pričakovali najmanjši razpon med najvišjo in najnižjo vrednostjo Ct . Kot je vidno iz Slike 17 smo domnevno tudi potrdili. Srednja vrednost Ct pri AdF je 12,65.

Pričakovali smo bistveno manj DNA AdC, čeprav glede na mediano za vrednost Ct (35,55) dvomimo v njihovo vlogo pri razvoju gastroenteritisa. Zaradi visoke občutljivosti PCR v realnem času je vprašljivo, če so vsi (nizko) pozitivni rezultati, ki jih dobimo s to metodo, tudi klinično pomembni. Lahko so prvi znak resne okužbe, a v mnogih primerih se bolezen sploh ne razvije (Landry in Ferguson, 2009).

V iztrebkih smo dokazali tudi prisotnost vrste AdE in sicer z mediano za vrednost Ct 26,22, kar je nedvomno s PCR pozitiven rezultat. Zanimivo je, da je bila ta vrsta zmeraj v hkratni okužbi bodisi z vrsto AdF, AdC ali celo z obema. Navzočnost te vrste v prebavilih ne potrjuje niti ne omenja noben vir, zato je vloga in določitev AdE v iztrebku dvomljiva. Dopuščamo možnost navzkrižne reakcije začetnih oligonukleotidov in sonde z drugo tarčo, vsekakor pa bi bile v prihodnje potrebne raziskave v tej smeri.

Pri primerjavi vrednosti Ct vzorcev, ki smo jih dokazali z ustaljenimi diagnostičnimi metodami in metodo PCR v realnem času, smo potrdili pričakovane rezultate. Vrednost Ct vzorcev, ki smo jih dokazali le s PCR v realnem času, so bile višje v primerjavi z vrednostmi vzorcev, pri katerih smo adenovirus dokazali bodisi z elektronsko mikroskopijo ali testom ELISA.

Pri vzorcih, ki smo jih določili le z molekularno metodo, je vrednost Ct znašala 29,71, tisti vzorci, ki so bili dokazani že v rutini z elektronsko mikroskopijo, pa so imeli nižjo vrednost Ct. Podobne rezultate smo dobili tudi s testom ELISA. Mediana za vrednost Ct pri vzorcih, kjer smo enterični adenovirus dokazali že v rutini, je bil 12,35, nasprotno smo pri vzorcih, pri katerih smo AdF dokazali šele z molekularno metodo, določili mediano vrednosti Ct nekoliko višje in sicer 17,34.

Na podlagi višjih vrednosti Ct ocenjujemo, da je v vzorcih manj tarčne DNA in tako nižja koncentracija virusa. Sklepamo, da sta metodi elektronske mikroskopije in ELISA odvisni od koncentracije virusov v testiranih vzorcih in da je občutljivost molekularne metode večja od elektronske mikroskopije in testa ELISA.

Pri primerjavi rezultatov metode ELISA, ki je specifična za AdF, in elektronske mikroskopije (Preglednica 11) smo v 11 vzorcih dokazali prisotnost AdF. Glede na tip določenega virusa smo z molekularno metodo pri 10 vzorcih potrdili okužbo z AdF, pri nekaterih tudi z AdE in AdC. Pri 4 preiskovancih pri katerih s testom ELISA nismo

potrdili okužbe, smo jo pa z elektronsko mikroskopijo, je tipizacija pri 2 potrdila okužbo z AdF ($C_t = 17,34; 11,14$), pri ostalih 2 pa okužbo z AdC ($C_t = 17,59; 44,27$). Pri 10 preiskovancih, pri katerih je bil rezultat testa ELISA pozitiven, elektronske mikroskopije pa negativen, smo z molekularno metodo okužbo potrdili v dveh primerih (AdF; $C_t = 8,47; 8,49$).

Pri izračunih občutljivosti in specifičnosti elektronske mikroskopije in testa ELISA smo privzeli 100% občutljivost in specifičnost metode PCR v realnem času in tako dobljene rezultate primerjali glede na molekularno metodo.

Izračunali smo, da je občutljivost elektronske mikroskopije 46,9%. To pomeni, da bomo z elektronsko mikroskopijo pri hipotetično 100 osebah, ki so okužene z adenovirusom, pravilno ugotovili okužbo pri 46 osebah. Pri 54 osebah bodo rezultati lažno negativni. Za elektronsko mikroskopijo je znano, da pogosto daje lažno negativne rezultate, predvsem takrat, ko je koncentracija virusa v vzorcih nizka (Wood in sod., 1989). Potrdili smo 17 lažno negativnih rezultatov, od tega je bilo kar 14 vzorcev od otrok, ki so bili mlajši od 33 mesecev. Preverili smo, katere vrste adenovirusov smo z elektronsko mikroskopijo »zgrešili« in kakšna je bila njihova vrednost C_t z metodo PCR v realnem času. Vrednost C_t je namreč merilo za relativno količino tarčne DNA. V 13 od 17 vzorcev smo potrdili AdC z mediano za vrednost C_t 36,33; pri 3 vzorcih od 17 smo ugotovili AdF z mediano za vrednost C_t 8,49 in v enem vzorcu smo našli AdB s C_t 36,98.

Visoka vrednost mediane C_t AdC nakazuje na to, da je v vzorcu relativno malo virusne DNA, iz česar sklepamo, da je koncentracija virusa v vzorcu nizka in ga z EM nismo mogli zaznati. Zaradi visokih vrednosti C_t pri AdC in AdB lahko celo sklepamo, da ti dve vrsti verjetno nista povzročitelja gastroenteritisa. V črevesje je virus lahko prešel iz dihal (kot povzročitelja dihalne okužbe) in se je z iztrebkom le izločil. Zaključimo lahko, da so dejansko lažno negativni rezultati z metodo EM bili le trije, saj smo v teh vzorcih s tipizacijo potrdili enterične adenoviruse z nizko vrednostjo C_t (mediana $C_t = 8,49$). Občutljivost EM metode za določanje enteričnih adenovirusov je torej dobra.

Specifičnost elektronske mikroskopije je 100%, kar pomeni, da smo pri vseh neokuženih osebah pravilno določili negativen rezultat. Lažno pozitivnih rezultatov nismo ugotovili, o njih pa poročajo v sorodnih raziskavah Logan C. in sodelavci (2006). V omenjeni raziskavi so z elektronsko mikroskopijo od 139 vzorcev v treh določili lažno pozitiven rezultat. S

PCR v realnem času, pri katerem so uporabili začetne oligonukleotide in sonde, ki določajo vse znane serotipe človeških adenovirusov, v teh vzorcih niso dokazali adenovirusne okužbe. Rezultate so si razlagali tako, da ti vzorci vsebujejo virusne delce, katerih morfologija je podobna adenovirusom a z majhno nukleotidno homologijo.

Občutljivost testa ELISA je večja od določanja adenovirusov z elektronsko mikroskopijo (de Jong in sod., 1993), kar smo ugotovili tudi v naši raziskavi. Določili smo, da je občutljivost testa ELISA, ki je namenjen dokazovanju vrste AdF, 80%. Specifičnost testa je 95,2%. Hipotetično na primeru 100 neokuženih ljudi to pomeni, da bomo pravilno določili negativen rezultat pri 95 osebah, ostale pa bomo identificirali kot lažno pozitivne. Dejansko smo določili 9 lažno pozitivnih rezultatov. Za te vzorce smo poiskali njihove vrednosti absorbance (OD pri 450 nm) in preverili, kako blizu so izmerjene vrednosti določeni mejni vrednosti detekcije (cut-off). Ta vrednost je po mnenju proizvajalca (Premier Adenoclone® Typ 40/41 EIA) 0,150. Ugotovili smo, da je v vzorcih vrednost absorbance večja od mejne vrednosti in so tako označeni kot pozitivni. Vrednosti absorbance so bile pri vseh vzorcih močno v pozitivnem delu skale, le en primer je bil pozitiven z vrednostjo OD 0,165, torej blizu mejnega območja. Po navedbah proizvajalca sta občutljivost in specifičnost testa ELISA 98%. Naši rezultati se torej razlikujejo glede na navedene podatke.

5.2 SKLEPI

- Z metodo PCR v realnem času smo adenoviruse dokazali v 15,8 % od 203 pregledanih vzorcev, z AdF vrstno specifičnim testom ELISA v 10,3 % in z metodo elektronske mikroskopije v 7,4 % od 203 vzorcev.
- Večina vzorcev, v katerih smo dokazali adenovirusno DNA, je pripadala skupini otrok mlajših od treh let in le manjšina skupini preiskovancev starih tri ali več let.
- Poleg enteričnih adenovirusov smo v preiskovanih vzorcih blata dokazali tudi DNA drugih vrst adenovirusa.
- Z uporabo interne kontrole smo ugotovili inhibicijo pomnoževanja DNA pri 15,8 % (32/203) vzorcev. Z uporabo BSA smo odpravili večino inhibicij.
- Glede na mediano za vrednost Ct (12,65) ocenujemo, da je v preiskovanih vzorcih virusna DNA prisotna v največji količini pri vrsti AdF.
- S primerjavo vrednosti Ct vzorcev, ki smo jih potrdili z ustaljenimi diagnostičnimi metodami in metodo PCR v realnem času, ocenujemo, da je količina virusne DNA višja, kot v vzorcih, kjer smo prisotnost adenovirusa ugotovili le z molekularno metodo
- Dokaz vrste AdE v iztrebku, ki smo jo dokazali izključno v kombinacijah z eno od drugih vrst adenovirusa, je neobičajen. Sklepamo, da gre pri tem za slabo specifičnost reakcija PCR za dokazovanje AdE. Za zanesljivo razlago rezultatov bi bile potrebne nadaljne raziskave.

6 POVZETEK

Akutni virusni gastroenteritis prizadene predvsem otroke, občasno pa tudi odrasle in starostnike. Med najpomembnejše povzročitelje prištevamo rotaviruse, noroviruse in enterične adenoviruse serotipov 40 in 41, ki skupaj tvorita vrsto adenovirusov F (AdF). Bolezen običajno mine sama po sebi in brez trajnih posledic. Nevarna je za tvegane skupine ljudi, kot so bolniki z imunsko pomanjkljivostjo, ter bolniki po transplantaciji kostnega mozga. V teh primerih je pomembna hitra in zanesljiva diagnostika.

Z diplomsko nalogo smo želeli preizkusiti molekularno metodo PCR v realnem času za dokaz adenovirusne DNA v iztrebkih bolnikov s simptomi virusnega gastroenteritisa. Rezultate smo primerjali s tistimi, ki so jih predhodno že določili v Laboratoriju za elektronsko mikroskopijo in diagnostiko gastroenteritičnih virusov s tradicionalnima diagnostičnima metodama, elektronske mikroskopije in encimskoimunske metode.

Zanimalo nas je tudi, katere vrste adenovirusov se izločajo v iztrebku, glede na dobljeno vrednost Ct pa smo želeli oceniti relativno količino adenovirusne DNA v vzorcih. Zaradi predvidene prisotnosti inhibitorjev reakcije PCR v naših vzorcih smo uporabili interno kontrolo, s katero smo preverili učinek izolacije in pomnoževanja nukleinske kisline.

Virusno nukleinsko kislino smo osamili iz 203 vzorcev. Osamitev smo izvedli z biorobotom MagNA Pure Compact. Za pomnoževanje in dokazovanje adenovirusne DNA smo uporabili metodo PCR v realnem času. V vsak vzorec smo pred osamitvijo DNA dodali tudi interno kontrolo. Od 203 kliničnih vzorcev so v rutinski diagnostiki z elektronsko mikroskopijo adenovirus potrdili v 7,4 %, s testom ELISA pa enterično adenovirusno okužbo v 10,3 % vseh testiranih vzorcev. Z molekularno metodo smo adenovirus dokazali v 15,8 % vzorcev. Poleg enteričnih adenovirusov AdF smo dokazali tudi okužbe z drugimi vrstami, med katerimi je prevladovala vrsta AdC.

S PCR v realnem času smo dokazali 25 adenovirusnih okužb pri otrocih mlajših od treh let. Ostalih 7 preiskovancev pri katerih smo potrdili adenovirusno okužbo je bilo starejših. Rezultati potrjujejo, da so adenovirusne okužbe prebavil najpogostejše pri otrocih do tretjega leta starosti.

Pri 32 vzorcih (15,8 %), pri katerih se interna kontrola ni pomnožila, smo rekacijo PCR v realnem času ponovili z dodatkom BSA. S tem smo odpravili večino inhibicij, interna kontrola se ni pomnožila le še v 1,5 % (3/203) vzorcev.

V vzorcih smo določili vrste AdF, AdC, AdE in AdB. Zaradi visoke mediane za vrednost Ct vrste AdC, ki smo jo zasledili v iztrebku, lahko upravičeno dvomimo v njeno vlogo pri razvoju gastroenteritisa. Dokaz vrste AdE, ki smo jo vedno dokazali z neko drugo vrsto in z nizko mediano za vrednost Ct, je zelo neobičajen in dopušča možnost navzkrižne reakcije začetnih oligonukleotidov in sonde z drugo tarčo. Vsekakor so za pravilno razlago teh rezultatov potrebne raziskave v prihodnje.

Z dokazom nizkih vrednosti Ct za AdF v iztrebkih ocenujemo, da sta serotipa 40 in 41 zelo odporna na delovanje različnih encimov, kar jima omogoča, da se v črevesju razmnožita do visokih titrov in povzročita gastroenteritis.

Iz rezultatov sklepamo, da so vzorci, ki smo jih potrdili le z metodo PCR v realnem času, vsebovali manj virusne DNA kot vzorci, ki so bili potrjeni že v rutinski diagnostiki, bodisi z metodo elektronske mikroskopije ali testom ELISA. Ocenujemo, da je občutljivost PCR v realnem času res večja od rutinskih metod in nam omogoča, da dokažemo okužbo kljub manjšemu bremenu virusa v vzorcu oz. kužnini.

7 VIRI

- Applied Biosystems. 2008. TaqMan RT-PCR assay. Leiden, ServiceXS
<http://www.servicexs.com/servicexs+is+powered+by/applied+biosystems/taqman+rt-pcr+assay/> (25. nov. 2009): 1 str.
- Bányai K., Kisfali P., Bogdán Á., Martella V., Melegh B., Erdman D., Szűcs. 2009. Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 28: 997-999
- Berensmeier S. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Applied Microbiology and Biotechnology, 73: 495-504
- Bienz K.A. 2005. General virology. V: Medical microbiology. Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. (eds.). New York, Thieme: 376-411
- de Jong J.C. 2003. Epidemiology of enteric adenoviruses 40 and 41 and other adenoviruses in immunocompetent and immunodeficient individuals. V: Viral gastroenteritis. Desselberger U., Gray J. (eds.). Rotterdam, Elsevier Science B.V.: 407-445
- de Jong J.C., Bijlsma K., Wermenbol A.G., Verweij-Uijterwaal M.W., van der Avoort H.G.A.M., Wood D.J., Bailey A.S., Osterhaus A.D.M.E. 1993. Detection, typing, and subtyping of enteric adenoviruses 40 and 41 from fecal samples and observation of changing incidences of infections with these types and subtypes. Journal of Clinical Microbiology, 31, 6: 1562-1569
- Desselberger U., Gray J. 2005. Viral gastroenteritis. Medicine, 33, 4: 78-80
- Diallo I.S., Hewitson G., Wright L., Rodwell B.J., Corney B.G. 2006. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 131: 92-98

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

Drinovec B. 2005. Poimenovanje in razvrstitev virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-21

Ebner K., Suda M., Watzinger F., Lion T. 2005. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two-reaction real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 7: 3049-3053

Echavarria M. 2008. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 4: 704-715

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

ExPASy Proteomics Server. 2009. Mastadenovirus: ViralZone. Lausanne, Swiss Institute of Bioinformatics

http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/183.html (3. dec. 2009): 1 str.

Favier A-L, Schoehn G., Jaquinod M., Harsi C., Chroboczek J. 2002. Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology*, 293, 1: 75-85

Filho E.P., da Costa Faria N.R., Fialho A.M., de Assis R.S., Almeida M.M.S., Rocha M., Galvão M., dos Santos F.B., Barreto M.L., Leite J.P.G. 2007. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 313-319

Gordis L. 2004. Assessing the validity and reliability of diagnostic and screening tests. V: Epidemiology. 3rd ed. Gordis L. (ed.). Philadelphia, Elsevier Saunders: 71-94

Haramoto E., Katayama H., Oguma K., Ohgaki S. 2007. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2153-2159

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

Ison M.G. 2006. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 43: 331-339

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

Ko G., Cromeans T.L., Sobsey M.D. 2005. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. *Water Research*, 39: 3643-3649

Landry M.L., Ferguson D. 2009. Polymerase chain reaction and the diagnosis of viral gastrointestinal disease due to cytomegalovirus, herpes simplex virus and adenovirus. *Journal of Clinical Virology*, doi:10.1016/j.jcv.2009.02.007

Lion T., Baumgartinger R., Watzinger F., Matthes-Martin S., Suda M., Preuner S., Futterknecht B., Lawitschka A., Peters C., Pötschger U., Gadner H. 2003. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood*, 102, 3: 1114-1120

Logan C., O'Leary J.J., O'Sullivan N. 2006. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 9: 3189-3195

Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6: 1292-1305

Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2005. Adenoviruses. V: Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby: 533-539

Niesters H.G.M. 2004. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10: 5-11

Oikarinen S., Tauriainen S., Viskari H., Simell O., Knip M., Virtanen S., Hyöty H. 2009. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *Journal of Clinical Virology*, 44: 211-214

Robinson C., Echavarria M. 2007. Adenoviruses. V: *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Murray P.R., Baron E. Y., Jorgenesn J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. (eds.). Washington, AMS Prees: 1589-1600

Roche Applied Science. 2008. MagNA Pure LC inctrument. Ljubljana, Roche farmacevtska družba d.o.o. ODG Diagnostics

https://www.roche-applied-science.com/ProdInfo/en_US/3_8_2_1_1.htm#TopicTitel007 (25. nov. 2009): 1 str.

Sano M., Kato Y., Taira K. 2006. Sequence-specific interference by small RNAs derived from adenovirus VAI RNA. *FEBS Letters*, 580: 1553-1564

Wood D.J. 1988. Adenovirus gastroenteritis. *British Medical Journal*, 296: 229-230

- The future of things. 2007. Sandwich ELISA schematic. Illinois, Biztech
<http://thefutureofthings.com/articles.php?itemId=37/56/> (25. nov. 2009): 1 str.
- Uhnoo I., Wadell G., Svensson L., Johansson M.E. 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 3: 365-372
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159
- 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
- Wilhelmi I., Roman E., Sánchez-Fauquier. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9: 247-262
- Wood D.J., Bijlsma K., de Jong J.C., Tonkin C. 1989. Evaluation of a commercial monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of adenovirus types 40 and 41 in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 6: 1155-1158

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Miroslavu Petrovcu, ki mi je omogočil opravljanje diplomske naloge pod njegovim mentorstvom, me vodil pri delu in nudil vso strokovno pomoč pri pisaju.

Zahvala gre tudi prof. dr. Tatjani Avšič Županc za hitro in natančno recenzijo naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Darji Žgur Bertok za prijaznost in potpečljivost pri dogovarjanju datuma zagovora.

Najlepša hvala asist. dr. Andreju Steyerju za temeljite popravke in napotke pri nastajanju dela ter za prijeten sprejem v sosednjem laboratoriju. Za potrežljivo uvajanje v molekularni svet in sproščeno delo se zahvaljujem tudi Moniki Jevšnik in vsem zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij.

Prisrčna hvala mojim staršem za vso podporo, ki sta mi jo nudila. Pokazala sta mi, da sta vztrajnost in volja pot do cilja.

Zahvaljujem se tudi prijateljem in sošolcem za pomoč pri študiju, nastajanju naloge in za veliko dobre volje in smeha.

PRILOGE

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB (BSA)	Ct	AdA (BSA)	AdA	AdD	AdD (BSA)
28.10.2008	ž	19 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (45,60)				NEG				NEG				NEG					
28.10.2008	m	7 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,32)				NEG				NEG				NEG					
28.10.2008	ž	53 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,87)				NEG				NEG				NEG					
28.10.2008	ž	6 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	NEG	NEG		NEG				NEG		NEG		NEG					
28.10.2008	ž	65 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,75)				NEG				NEG				NEG					
28.10.2008	m	5 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,71)				NEG				NEG				NEG					
28.10.2008	m	8 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,61)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	ž	7 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,04)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	m	77 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,42)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	m	31 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,65)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
29.10.2008	ž	6 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (29,95)	NEG		NEG		NEG		NEG		POZ	41,16	NEG		NEG			
29.10.2008	ž	35 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,88)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	m	6 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,47)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	ž	3 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,50)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	m	68 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (32,95)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	ž	61 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (35,79)				NEG				NEG				NEG					
29.10.2008	m	7 m	NEG	POZ	NEG	NEG		POZ (29,21)				NEG				NEG				NEG		NEG		NEG	
30.10.2008	ž	24 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,82)				NEG				NEG				NEG					
30.10.2008	ž	4 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,67)				NEG				NEG				NEG					
30.10.2008	m	3 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (34,96)				NEG				NEG				NEG					
31.10.2008	ž	5 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (29,40)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
31.10.2008	m	7 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (43,17)				NEG				NEG				NEG					
31.10.2008	m	66 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,73)				NEG				NEG				NEG					

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdD	AdD (BSA)
31.10.2008	m	84 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,42)				NEG				NEG				NEG					
31.10.2008	m	81 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,59)				NEG				NEG				NEG					
31.10.2008	m	4 let	NEG	NEG	POZ	POZ	11,14	POZ (44,20)				POZ	21,03			NEG				NEG			NEG		NEG
1.11.2008	m	18 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,57)				NEG				NEG				NEG					
1.11.2008	m	10 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,55)				NEG				NEG				NEG					
1.11.2008	m	2 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,72)				NEG				NEG				NEG					
2.11.2008	ž	58 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,88)				NEG				NEG				NEG					
2.11.2008	ž	58 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,79)				NEG				NEG				NEG					
2.11.2008	m	16 m	NEG	POZ	NEG	NEG		NEG	NEG	POZ	8,49	NEG		POZ	18,68	NEG		NEG		NEG		NEG	NEG	NEG	NEG
2.11.2008	m	21 m	NEG	POZ	POZ	POZ	12,05	POZ (47,02)				POZ	25,15			NEG				NEG			NEG		NEG
3.11.2008	ž	0 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,71)				NEG			POZ	24,86			NEG						
3.11.2008	ž	9 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (32,00)				NEG			NEG				NEG						
3.11.2008	m	10 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,03)				NEG			NEG				NEG						
3.11.2008	m	28 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,46)				NEG			NEG				NEG						
3.11.2008	ž	20 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (28,29)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
3.11.2008	ž	43 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (29,32)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
3.11.2008	m	14 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,22)				NEG			NEG				NEG						
3.11.2008	ž	27 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,95)				NEG			NEG				NEG						
4.11.2008	ž	16 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,35)				NEG			NEG				POZ	36,98					
4.11.2008	m	4 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,40)				NEG			NEG				NEG						
4.11.2008	ž	14 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,75)				NEG			NEG				NEG						
4.11.2008	ž	59 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,63)				NEG			NEG				NEG						
5.11.2008	m	9 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,86)				NEG			NEG				NEG						
5.11.2008	m	4 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (28,16)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdA (BSA)	AdD	AdD (BSA)	
5.11.2008	m	10 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,76)				NEG				POZ	38,45			NEG							
5.11.2008	m	4 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,44)				NEG				NEG				NEG							
6.11.2008	m	4 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (26,60)	POZ	21,46	NEG		POZ	37,96	NEG		NEG		NEG		NEG					
6.11.2008	m	13 m	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	NEG	NEG		NEG		NEG		NEG	NEG	NEG		NEG		NEG					
6.11.2008	ž	2 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,55)				NEG				NEG				NEG							
6.11.2008	m	5 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,52)				NEG				NEG				NEG							
6.11.2008	ž	7 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,71)				NEG				NEG				NEG							
6.11.2008	m	4 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,84)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	ž	10 m	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,56)	NEG		NEG		NEG		NEG		POZ	27,26	NEG		NEG					
7.11.2008	m	9 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,31)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	m	5 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,50)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	ž	12 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (35,41)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	ž	9 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,48)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	ž	42 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (32,04)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	m	62 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (32,26)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG					
7.11.2008	m	24 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,08)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	m	4 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,94)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	m	27 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,27)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	ž	17 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (31,07)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG					
7.11.2008	ž	17 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (31,05)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG					
7.11.2008	ž	17 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,82)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	ž	18 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,07)				NEG				NEG				NEG							
7.11.2008	ž	18 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (32,17)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG					
7.11.2008	m	4 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (34,25)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG					

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdD	AdD (BSA)
8.11.2008	ž	71 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,56)				NEG				NEG				NEG					
8.11.2008	ž	78 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,99)				NEG				NEG				NEG					
8.11.2008	ž	9 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,86)				NEG				NEG				NEG					
8.11.2008	m	5 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,07)				NEG				NEG				NEG					
9.11.2008	ž	1 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,53)				NEG				NEG				NEG					
9.11.2008	ž	1 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (32,53)				NEG				NEG				NEG					
9.11.2008	m	23 m	NEG	NEG	POZ	NEG		NEG	POZ (30,82)	NEG		NEG		NEG		NEG		POZ	17,59	NEG		NEG	NEG	NEG	NEG
10.11.2008	m	7 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,11)				NEG				NEG				NEG					
10.11.2008	ž	6 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,54)				NEG				NEG				NEG					
10.11.2008	m	7 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,95)				NEG				POZ	16,96			NEG					
10.11.2008	m	3 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,45)				NEG				NEG				NEG					
10.11.2008	m	11 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,87)				NEG				POZ	38,6			NEG					
10.11.2008	m	17 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,02)				NEG				POZ	26,12			NEG					
10.11.2008	m	3 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,32)				NEG				NEG				NEG					
10.11.2008	m	45 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,84)				NEG				NEG				NEG					
10.11.2008	ž	65 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (27,93)				NEG				NEG				NEG					
10.11.2008	ž	78 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,28)				NEG				NEG				NEG					
11.11.2008	ž	63 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,17)				NEG				NEG				NEG					
11.11.2008	ž	65 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,97)				NEG				NEG				NEG					
11.11.2008	ž	37 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (31,00)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG					
11.11.2008	m	31 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,09)				NEG				NEG				NEG					
11.11.2008	m	13 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,67)				NEG				NEG				NEG					
11.11.2008	ž	51 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,55)				NEG				NEG				NEG					
11.11.2008	ž	52 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,75)				NEG				NEG				NEG					

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdD	AdD (BSA)
11.11.2008	m	26 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,71)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
11.11.2008	ž	4 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,19)			NEG			NEG				NEG				NEG			
11.11.2008	ž	15 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,12)			NEG			NEG				NEG				NEG			
11.11.2008	m	9 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,61)			NEG			NEG				NEG				NEG			
11.11.2008	ž	17 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,51)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
11.11.2008	ž	78 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,00)			NEG			NEG				NEG				NEG			
11.11.2008	ž	10 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (35,44)			NEG			NEG				NEG				NEG			
11.11.2008	ž	52 let	NEG	POZ	NEG	NEG		POZ (32,21)			NEG			NEG				NEG				NEG		NEG	
12.11.2008	ž	16 m	NEG	NEG	NEG			NEG	POZ (30,48)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
12.11.2008	ž	14 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (34,97)			NEG			NEG				NEG				NEG			
12.11.2008	ž	51 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,62)			NEG			NEG				NEG				NEG			
12.11.2008	m	7 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (43,62)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	ž	37 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,52)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
13.11.2008	ž	49 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (32,06)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	ž	49 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,01)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	m	12 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,35)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
13.11.2008	ž	3 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (32,88)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	ž	35 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (45,94)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	m	4 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,68)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
13.11.2008	m	33 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (33,49)			NEG			NEG				POZ	36,96			NEG			
13.11.2008	m	16 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,81)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	m	8 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,16)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	ž	18 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,75)			NEG			NEG				NEG				NEG			
13.11.2008	m	76 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,89)			NEG			NEG				NEG				NEG			

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdD	AdD (BSA)
14.11.2008	ž	36 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (30,98)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
14.11.2008	ž	1 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,24)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	ž	41 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,51)			NEG			NEG				NEG							
14.11.2008	ž	18 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,53)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	m	4 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (33,27)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	m	1 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,00)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	m	69 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,11)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	ž	3 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,68)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	ž	1 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,28)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	ž	19 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,82)			NEG			NEG				NEG			NEG				
14.11.2008	ž	24 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,12)			NEG			POZ 29,27				NEG							
15.11.2008	m	6 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,40)			NEG			NEG				NEG			NEG				
15.11.2008	m	16 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,85)			NEG			NEG				NEG			NEG				
16.11.2008	m	5 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,99)			NEG			NEG				NEG			NEG				
16.11.2008	m	15 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,78)			NEG			NEG				NEG			NEG				
16.11.2008	ž	97 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (33,14)			NEG			NEG				NEG			NEG				
16.11.2008	m	30 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (34,65)			NEG			POZ 45,56				NEG							
17.11.2008	m	16 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,96)			NEG			NEG				NEG			NEG				
17.11.2008	m	25 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,79)			NEG			NEG				NEG			NEG				
17.11.2008	m	74 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,03)			NEG			NEG				NEG			NEG				
18.11.2008	ž	69 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,29)			NEG			NEG				NEG			NEG				
18.11.2008	ž	21 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,29)			NEG			NEG				NEG			NEG				
18.11.2008	ž	1 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,36)			NEG			NEG				NEG			NEG				
18.11.2008	m	5 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,11)			NEG			NEG				NEG			NEG				

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdD	AdD (BSA)
18.11.2008	ž	54 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,40)				NEG				NEG				NEG					
18.11.2008	m	33 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,99)				NEG				NEG				NEG					
18.11.2008	ž	5 m	NEG	POZ	NEG	NEG		POZ (29,90)				NEG				NEG				NEG			NEG		NEG
19.11.2008	ž	16 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,71)				NEG				NEG				NEG					
19.11.2008	m	36 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (38,98)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
19.11.2008	m	21 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (39,30)				NEG				NEG				NEG					
19.11.2008	ž	5 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,20)				NEG				NEG				NEG					
19.11.2008	m	77 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,63)				NEG				NEG				NEG					
19.11.2008	m	3 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,84)				NEG				NEG				NEG					
19.11.2008	ž	58 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,39)				NEG				NEG				NEG					
19.11.2008	ž	16 m	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (32,94)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
19.11.2008	ž	38 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (40,98)				NEG				NEG				NEG					
20.11.2008	ž	2 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,24)				NEG				NEG				NEG					
20.11.2008	ž	0 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,99)				NEG				NEG				NEG					
20.11.2008	ž	8 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,36)				NEG				NEG				NEG					
20.11.2008	m	61 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,93)				NEG				NEG				NEG					
20.11.2008	m	6 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,84)				NEG				POZ 38,03				NEG					
20.11.2008	ž	3 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (29,99)	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG			
20.11.2008	ž	12 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (33,31)				NEG				NEG				NEG					
21.11.2008	ž	5 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (36,4)				NEG				NEG				NEG					
21.11.2008	m	18 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,19)				NEG				NEG				NEG					
21.11.2008	ž	61 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (39,95)				NEG				NEG				NEG					
21.11.2008	m	14 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (31,43)				NEG				NEG				NEG					
21.11.2008	m	17 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (32,62)				NEG				NEG				NEG					

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdD	AdD (BSA)
21.11.2008	m	11 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,57)				NEG				POZ	17,96			NEG					
22.11.2008	ž	21 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,89)				NEG				NEG				NEG					
22.11.2008	ž	1 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,49)				NEG				NEG				NEG					
22.11.2008	ž	63 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,14)				NEG				NEG				NEG					
22.11.2008	ž	3 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,75)				NEG				NEG				NEG					
23.11.2008	m	3 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,86)				NEG				NEG				NEG					
23.11.2008	ž	8 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,44)				NEG				NEG				NEG					
23.11.2008	m	36 let	NEG	NEG	NEG	NEG		NEG	POZ (29,64)	NEG		NEG				NEG				NEG					
24.11.2008	m	37 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,41)				NEG				NEG				NEG					
24.11.2008	ž	3 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,41)				NEG				NEG				NEG					
24.11.2008	m	0 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (29,43)				NEG				NEG				NEG					
24.11.2008	m	8 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (37,25)				NEG				NEG				NEG					
24.11.2008	m	9 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,91)				NEG				NEG				NEG					
24.11.2008	ž	81 let	NEG	POZ	NEG	NEG		POZ (29,61)				NEG				NEG				NEG			NEG		NEG
25.11.2008	m	44 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,73)				NEG				NEG				NEG					
25.11.2008	m	0 m	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (28,42)				NEG				NEG				NEG					
30.11.2008	m	28 m	NEG	POZ	POZ	NEG		NEG	NEG	POZ	8,97	NEG			POZ	18,37	NEG		NEG		NEG		NEG	NEG	NEG
1.12.2008	m	6 m	NEG	POZ	POZ	POZ	17,27	POZ (36,01)				POZ	27,33			NEG				NEG			NEG		NEG
2.12.2008	m	18 m	NEG	POZ	POZ	NEG		NEG	NEG	POZ	11,97	NEG			POZ	20,42	NEG		NEG		NEG		NEG	NEG	NEG
4.12.2008	ž	3 m	NEG	POZ	POZ	POZ	20,84	POZ (35,70)				POZ	31,6			NEG				NEG			NEG		NEG
5.12.2008	ž	22 m	NEG	POZ	POZ	POZ	12,65	POZ (43,91)				POZ	25,22			POZ	33,34			NEG			NEG		NEG
5.12.2008	m	3 let	K-N	POZ	POZ	NEG		POZ (40,02)				POZ	46,98			POZ	47			NEG			NEG		NEG
5.12.2008	ž	25 m	NEG	POZ	POZ	POZ	14,74	POZ (43,08)				POZ	27,06			POZ	34,77			NEG			NEG		NEG

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Priloga A1: Rezultati 203 vzorcev, ki smo jih določili z ustaljenim diagnostičnim testiranjem - test ELISA in elektronska mikroskopija (rezultati pridobljeni iz laboratorija EMI) in rezultati molekularne metode PCR v realnem času. Okrajšave: m - mesec, EM - elektronska mikroskopija, ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, BSA - Bovine Serum Albumin, (BSA) - rezultat vzorca po dodatku BSA, IC - interna kontrola, K-N - kalicivirus-norovirus, R sk. A - rotavirus skupine A, As - astrovirus, POZ - pozitivno, NEG - negativno.

Datum sprejema	Spol	Starost	ELISA (ostali)	ELISA (AdF)	EM (Ad)	PCR (AdF)	Ct	IC	IC (BSA)	AdF (BSA)	Ct	AdE	Ct	AdE (BSA)	Ct	AdC	Ct	AdC (BSA)	Ct	AdB	Ct	AdB (BSA)	AdA	AdA (BSA)	AdD	AdD (BSA)		
10.12.2008	ž	1 m	NEG	POZ	POZ	POZ	14,98	POZ (41,95)				POZ	26,22			NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
11.12.2008	m	11 m	POZ R sk. A	NEG	NEG	NEG		POZ (29,05)				NEG				NEG				NEG								
12.12.2008	ž	8 let	NEG	NEG	NEG	NEG		POZ (30,74)				NEG				NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
12.12.2008	ž	3 m	NEG	POZ	POZ	POZ	13,51	POZ (40,84)				POZ	27,51			NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
13.12.2008	ž	6 let	NEG	NEG	POZ	POZ	17,34	POZ (31,51)				POZ	28,15			NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
15.12.2008	m	11 m	POZ R sk. A	POZ	NEG	NEG		POZ (32,56)				NEG				NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
17.12.2008	m	9 let	POZ K-N	POZ	NEG	NEG		NEG	NEG	NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG		NEG
19.12.2008	ž	81 let	POZ R sk. A	POZ	NEG	NEG		POZ (28,91)				NEG				NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
19.12.2008	m	24 m	NEG	NEG	POZ	NEG		POZ (35,91)				POZ	37,92			POZ	44,27			NEG			NEG		NEG		NEG	
20.12.2008	ž	22 m	NEG	POZ	POZ	POZ	11	POZ (43,43)				POZ	20,97			NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
22.12.2008	m	12 let	POZ As	NEG	NEG	NEG		POZ (30,26)				NEG				POZ	36,33			NEG								
22.12.2008	ž	70 let	POZ R sk. A	POZ	NEG	NEG		POZ (29,72)				NEG				NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	
27.12.2008	m	24 m	POZ K-N	POZ	NEG	POZ	8,47	POZ (45,95)				POZ	21,13			NEG				NEG			NEG		NEG		NEG	