

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina ŽIGON

**DOKAZ ADENO-, RINO- IN
METAPNEVMOVIRUSOV IZ SPODNJIH DIHAL
OTROK Z OBSTRUKTIVNO PLJUČNO BOLEZNIJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina ŽIGON

**DOKAZ ADENO-, RINO- IN METAPNEUMOVIRUSOV IZ SPODNJIH DIHAL
OTROK Z OBSTRUKTIVNO PLJUČNO BOLEZNIJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF ADENO-, RHINO- AND METAPNEUMOVIRUSES IN
RESPIRATORY TRACT OF CHILDREN SUFFERING FROM OBSTRUCTIVE
PULMONARY DISEASE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Jožico Marin, univ. dipl. biolog. in za recenzentko doc. dr. Evo Ružić-Sabljić, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin

Recenzentka: doc. dr. Eva Ružić-Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Jožica MARIN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina Žigon

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7: 616.23/.24-07 (043) =863
- KG adenovirusi /rinovirusi/človeški metapnevmovirus/virusne okužbe
dihal/otroci/spodnja dihala/obstruktivna pljučna bolezen/PCR
- AV ŽIGON, Nina
- SA MARIN, Jožica (mentorica)/ RUŽIČ-SABLJIČ Eva (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2007
- IN DOKAZ ADENO-, RINO- IN METAPNEVMOVIRUSOV IZ SPODNJIH DIHAL
OTROK Z OBSTRUKTIVNO PLJUČNO BOLEZNIJO
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 84 str., 15 pregl., 12 sl., 112 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Virusne okužbe dihal predstavljajo pomemben vzrok obolevnosti in smrtnosti po vsem svetu in so najpomembnejši vzrok za obisk otrok pri zdravniku. Obstruktivna pljučna bolezen predstavlja resno oviro za normalen razvoj otroka. Povzročitelji tega stanja so najverjetneje virusi. Cilj naše raziskave je bil, da z dvostopenjsko verižno reakcijo s polimerazo nested-PCR (n-PCR) določimo DNA adenovirusov (Adv), z enostopenjsko verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) pa RNA rinovirusov (RV) ter RNA človeškega metapnevmovirusa (hMPV) v kužninah iz zgornjih in spodnjih dihal otrok s to boleznijo. Virusno DNA in RNA smo osamili iz zamrznjenih kužnin, zbranih v obdobju od leta 2003 do vključno leta 2005, od otrok, starih od 4 mesecev do 16 let. Po končani reakciji pomnoževanja smo pridelke PCR določili z elektroforezo v 2 % (u/v) agaroznem gelu. Od 63 kužnin (30 iz zgornjih, 33 iz spodnjih dihal) smo Adv dokazali skupno v 10/63 (15,8 %), RV v 3/63 (4,7 %) in hMPV v 5/63 (7,9 %) kužnin. Kužnine, v katerih smo dokazali viruse, so bile večinoma iz zgornjih dihal. Samo v eni kužnini smo določili dve vrsti virusa, RV in Adv. Kužnine, ki so imele po reakciji n-PCR pozitiven rezultat za Adv, smo testirali še z metodo PCR Adenovirus consensus[®]. Metodi nista dali enakih rezultatov. V raziskavi smo ugotovili, da se Adv, RV in hMPV nahajajo predvsem v zgornjih in tudi v spodnjih dihalih otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Poleg omenjenih virusov so lahko v dihalih teh otrok tudi mnogi drugi virusi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 578.7: 616.23/.24-07 (043) =863
- CX adenoviruses/rhinoviruses/human metapneumovirus/viral respiratory infections/children/lower respiratory tract/obstructive pulmonary disease/PCR
- AU ŽIGON, Nina
- AA MARIN, Jožica (supervisor)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TI DETECTION OF ADENO-, RHINO- AND METAPNEUMOVIRUSES IN RESPIRATORY TRACT OF CHILDREN SUFFERING FROM OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XIII, 84 p., 15 tab., 12 fig., 112 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Viral respiratory infections represent a significant cause of morbidity and mortality worldwide; they are also the most important reason why children usually see a doctor. Obstructive pulmonary disease is a serious impediment for a normal child's development. It is probably caused by different respiratory viruses. The objective of our research was to determine the DNA of adenoviruses (Adv) by means of the two-step nested polymerase chain reaction (n-PCR), and the RNA of rhinoviruses (RV) and human metapneumovirus (hMPV) by means of the single-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The previously mentioned viruses are found in the clinical material of upper and lower respiratory tract of children suffering from the disease. We extracted the viral DNA and RNA from the frozen specimens collected during the years 2003 to 2005. The specimens were found in children from 4 months to 16 years of age. After DNA and RNA amplification, Adv, RV and hMPV amplicons were identified by means of electrophoresis in a 2 % (w/v) agarose gel. From a total of 63 specimens (30 from upper, 33 from lower respiratory tract) Adv was detected in 10/63 (15,8 %) specimens, RV in 3/63 (4,7 %) specimens and hMPV in 5/63 (7,9 %) specimens. These specimens were mostly from upper respiratory tract. There was only one specimen where two viruses, Adv and RV, were detected. The specimens which had a positive result after using n-PCR assay were retested with PCR Adenovirus consensus[®] assay. The methods did not reveal comparable results. We agree that Adv, RV and hMPV are found mainly in upper but also in lower respiratory tracts of children with obstructive pulmonary disease. Besides the viruses mentioned above, there are other viruses possibly found in sick children as well.

KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	X
Kazalo slik	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ADENOVIRUSI	3
2.1.1 Morfologija in struktura	3
2.1.2 Razmnoževanje	4
2.1.3 Patogeneza	5
2.1.4 Imunost proti adenovirusom	6
2.1.5 Epidemiologija	6
2.1.6 Bolezni in klinični znaki	7
2.1.6.1 Okužbe dihal	8
2.1.6.1.1 Okužbe dihal pri otrocih	8
2.1.6.1.2 Akutne dihalne bolezni pri vojaških novincih	10
2.1.6.2 Okužbe oči	10
2.1.6.3 Okužbe prebavnega trakta	11
2.1.6.4 Druge okužbe	11
2.1.6.5 Okužbe pri imunsko pomanjkljivih osebah	11
2.1.7 Laboratorijska diagnostika okužb z adenovirusi	11
2.1.7.1 Dokazovanje virusa na celični kulturi	11
2.1.7.2 Detekcija virusnih antigenov neposredno v kužnini	12
2.1.7.3 Dokazovanje nukleinske kisline	12

2.1.7.4	Serološke preiskave	13
2.1.7.5	Diagnostika enteričnih adenovirusov (serotip 40 – 42)	13
2.1.8	Zdravljenje okužb, ki jih povzročajo adenovirusi	13
2.2	RINOVIRUSI	14
2.2.1	Morfologija in struktura	14
2.2.2	Razmnoževanje	15
2.2.3	Patogeneza	16
2.2.4	Imunost proti rinovirusom	16
2.2.5	Epidemiologija	17
2.2.6	Bolezni in klinični znaki	17
2.2.6.1	Okužbe otrok z rinovirusom	18
2.2.7	Laboratorijska diagnostika okužb z rinovirusi	19
2.2.8	Zdravljenje okužb, ki jih povzročajo rinovirusi	20
2.3	ČLOVEŠKI METAPNEVMOVIRUS	21
2.3.1	Morfologija in struktura	21
2.3.2	Razmnoževanje	23
2.3.3	Patogeneza	24
2.3.4	Imunost proti človeškemu metapnevmovirusu	25
2.3.5	Epidemiologija	26
2.3.6	Bolezni in klinični znaki	26
2.3.6.1	Okužbe otrok s človeškim metapnevmovirusom	26
2.3.6.2	Okužbe s človeškim metapnevmovirusom pri odraslih osebah	28
2.3.6.3	Okužbe s človeškim metapnevmovirusom pri imunsko pomanjkljivih osebah	28
2.3.7	Laboratorijska diagnostika okužb s človeškim metapnevmovirusom	29
2.3.7.1	Dokazovanje virusa na celični kulturi	29
2.3.7.2	Dokazovanje nukleinske kisline	29
2.3.7.3	Dokazovanje protiteles	29
2.3.7.3.1	Posredna imunofluorescenca	29
2.3.7.3.2	Encimskoimunski test	30

2.3.7.4	Detekcija virusnih antigenov neposredno v kužnini	30
2.3.7.5	Elektronska mikroskopija	30
2.3.8	Zdravljenje okužb, ki jih povzroča človeški metapnevmovirus	30
3	MATERIAL IN METODE	32
3.1	MATERIAL	32
3.1.1	Klinični material	32
3.1.2	Komercialni komplet QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit za osamitev virusne DNA (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija)	32
3.1.3	Komercialni komplet RNeasy[®] Protect Mini Kit za osamitev virusne RNA (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija)	33
3.1.4	Reagenti za izvedbo PCR	33
3.1.4.1	"klasični" PCR in n-PCR za pomnoževanje DNA adenovirusov	33
3.1.4.2	RT-PCR za pomnoževanje RNA rinovirusov	34
3.1.4.3	RT-PCR za dokaz RNA človeškega metapnevmovirusa	34
3.1.5	Oznake in sosledja začetnih oligonukleotidov (TIB[®] Molbiol, Berlin, Nemčija)	34
3.1.6	Material za izvedbo elektroforeze v agaroznem gelu za dokaz pridelkov PCR	36
3.1.7	Komercialni komplet Adenovirus Consensus[®] za določanje vrst adenovirusov (AREGENE, Francija)	37
3.1.8	Laboratorijska oprema in aparature	38
3.2	METODE	39
3.2.1	Priprava kliničnega materiala	39
3.2.2	Osamitev virusne DNA	39
3.2.3	Osamitev virusne RNA	40
3.2.4	Verižna reakcija s polimerazo	41
3.2.4.1	Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo (PCR), verižne reakcije s polimerazo nested-PCR (n-PCR) in enostopenjske verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR)	41
3.2.4.2	Izvedba reakcije PCR za pomnoževanje odseka genoma adenovirusov, rinovirusov in metapnevmovirusa	42

3.2.5	Pogoji za uspešno izvedbo reakcije PCR	46
3.2.6	Priprava vzorcev za elektroforezo, elektroforeza in detekcija pridelkov PCR v agaroznem gelu	46
3.2.6.1	Osnove elektroforeze	46
3.2.6.2	Izvedba elektroforeze	47
3.2.7	Poskus določanja vrst adenovirusov	47
3.2.7.1	PCR Adenovirus Consensus®	48
3.2.7.2	Detekcija pridelkov PCR	50
3.2.7.2.1	Hibridizacija	50
3.2.7.2.2	Validacija testa in določitev mejne (cut-off) vrednosti	51
3.2.7.2.3	Interpretacija rezultatov	52
3.2.7.3	Detekcija pridelkov PCR za določitev vrst adenovirusov	52
4	REZULTATI	55
4.1	POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA GENOMA ADENOVIRUSOV V REAKCIJI nested-PCR TER ODSEKA GENOMA RINOVIRUSOV IN METAPNEVMOVIRUSA V REAKCIJI RT-PCR	55
4.1.1	Adenovirusi	55
4.1.2	Rinovirusi	56
4.1.3	Človeški metapnevmovirus	56
4.2	DOKAZOVANJE ADENOVIRUSOV, RINOVIRUSOV IN ČLOVEŠKEGA METAPNEVMOVIRUSA V KLINIČNEM MATERIALU	57
4.2.1	Bolniki in značilnosti kužnin	57
4.3	DOLOČANJE POSAMEZNIH VRST ADENOVIRUSOV Z METODO PCR ADENOVIRUS CONSENSUS®	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	63
5.1	RAZPRAVA	63
5.1.1	Virusne okužbe dihal	63
5.1.2	Osamitev, pomnoževanje in detekcija adenovirusov, rinovirusov in človeškega metapnevmovirusa	64

5.1.3	Značilnosti kužnin	65
5.1.4	Določanje vrst adenovirusov v kužninah, ki so imele po reakciji nested-PCR pozitiven rezultat, z metodo PCR Adenovirus Consensus[®]	66
5.1.5	Zaključek	68
5.2	SKLEPI	69
6	POVZETEK	70
7	VIRI	71
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1	Bolezni, ki jih povzročajo adenovirusi (Brooks, 2001a: 381)	8
Preglednica 3.1	Tarčni geni	35
Preglednica 3.2	Skupinsko specifični začetni oligonukleotidi	36
Preglednica 3.3	Sestava reakcijske mešanice za klasični PCR in nested-PCR za adenoviruse	43
Preglednica 3.4	Program klasičnega PCR in nested-PCR za pomnoževanje odseka adenovirusov	44
Preglednica 3.5	Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR za rinoviruse	44
Preglednica 3.6	Program RT-PCR za pomnoževanje odseka rinovirusov	45
Preglednica 3.7	Sestava reakcijske mešanice za RT-PCR za metapnevmovirus	45
Preglednica 3.8	Program RT-PCR za pomnoževanje odseka metapnevmovirusa	46
Preglednica 3.9	Shema za reakcijo PCR Adenovirus Consensus [®]	48
Preglednica 3.10	Program PCR Adenovirus Consensus [®]	49
Preglednica 4.1	Kužnine iz zgornjih dihal ter rezultati reakcije nested-PCR in reakcije RT-PCR	57
Preglednica 4.2	Kužnine iz spodnjih dihal ter rezultati reakcije nested-PCR in reakcije RT-PCR	59
Preglednica 4.3	Številčni prikaz navzočnosti adenovirusov, rinovirusov in človeškega metapnevmovirusa v zgornjih in spodnjih dihalih	60
Preglednica 4.4	Rezultati reakcije nested-PCR in reakcije PCR Adenovirus Consensus [®]	61

KAZALO SLIK

Slika 2.1	Zgradba adenovirusov (Murray in sod., 2002a: 468)	3
Slika 2.2	Prikaz polipeptidov kapside in nukleokapsidni kompleks iz polipeptidov V in VII ter DNA (Brooks in sod., 2001a: 376)	4
Slika 2.3	Poenostavljena mapa genoma adenovirusov (Brooks in sod., 2001a: 378)	5
Slika 2.4	Zgradba rinovirusov (Brooks in sod., 2001b: 445)	14
Slika 2.5	Struktura rinovirusne RNA in genetska organizacija poliproteina (Brooks in sod., 2001b: 446)	15
Slika 2.6	Vezavno mesto protivirusnega zdravila v VP1 rinovirusov (Brooks in sod., 2001b: 445)	20
Slika 2.7	Elektronsko mikroskopska posnetka človeškega metapnevmovirusa (Hamelin in sod., 2004: 984; Alto, 2004: 467)	21
Slika 2.8	Genomska ureditev respiratornega sincicijskega virusa in človeškega metapnevmovirusa (Hamelin in sod., 2004: 985)	22
Slika 2.9	Zgradba človeškega metapnevmovirusa (Boivin, 2005: 7)	23
Slika 4.1	Elektroforezni prikaz rezultatov pomnoževanja 142 bp dolgega odseka gena za hekson adenovirusa z metodo nested-PCR	55
Slika 4.2	Elektroforezni prikaz rezultatov pomnoževanja 380 bp dolgega odseka 5' nekodirajoče regije (5'-NCR) rinovirusa z metodo RT-PCR	56
Slika 4.3	Elektroforezni prikaz rezultatov pomnoževanja 450 bp dolgega odseka gena za fuzijski protein (F) človeškega metapnevmovirusa z metodo RT-PCR	56

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Adv	adenovirus
BAL	bronhoalveolarni izpirek (angl.: bronchoalveolar lavage)
bp	bazni par
CAR	celični receptor pri kokseki- in adenovirusu (angl.: coxsackievirus and adenovirus receptor)
cDNA	komplementarna DNA (angl.: complementary DNA)
ddH ₂ O	demineralizirana destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl.: deoksiribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
EIZ	enota za intenzivno zdravljenje
ELISA	encimskoimunski test (angl.: enzyme linked immunosorbent assay)
hMPV	človeški metapneumovirus (angl.: human metapneumovirus)
ICAM-1	celična adhezijska molekula (angl.: intracellular adhesion molecule1)
IFN	interferon
IL	interlevkin
VI	virus influence (angl.: influenza virus)
mRNA	informacijska RNA (angl.: messenger RNA)
5'-NCR	5'- nekodirajoča regija (angl.: 5'- noncoding region)
NK	naravna celica ubijalka (angl.: natural killer)
NMSO ₃	sulfatna sialična lipidna molekula (C ₆₀ H ₁₁₂ NO ₂₃ S ₄ Na ₄)
n-PCR	dvostopenjska verižna reakcija s polimerazo nested-PCR (angl.: nested polymerase chain reaction)
PCR Adenovirus Consensus [®]	PCR-hibridizacijski-encimskoimunski test (angl.: PCR-hybridization-immunoenzymatic assay)
OD	optična gostota (angl.: optical density)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl.: polymerase chain reaction)
VPI	virus parainfluence (angl.: parainfluenza virus)
RNA	ribonukleinska kislina (angl.: ribonucleic acid)
RSV	respiratorni sincicijski virus

RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription-polymerase chain reaction)
RV	rinovirus
T _H	celica T pomagalka (angl.: T-helper)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (angl.: tumor necrosis factor)
VA RNA	oznaka za kratke segmente RNA (angl.: virus-associated)

1 UVOD

Virusne okužbe dihal so velik zdravstveni in gospodarski problem, saj predstavljajo pomemben vzrok obolevnosti in smrtnosti po vsem svetu (Stockton in sod., 2002; Bastien in sod., 2003; Alto, 2004; van Benten in sod., 2005). Bolezni so kužne in se hitro širijo med ljudmi. Pri otrocih 65 – 75 % okužb dihal povzročajo virusi. V prvem letu življenja lahko otroci prebolijo 8 – 10 virusnih okužb dihal. Ocenjujejo, da so bolezni dihal pomemben vzrok smrti pri otrocih, mlajših od 5 let (Monto in Lehman, 1998; Demers in sod., 2000; McAdam in sod., 2004; Cabello in sod., 2006; Kusel in sod., 2006). Vstopno mesto virusov v telo so dihala, kjer se razmnožujejo in praviloma povzročajo žariščno okužbo. Respiratorni virusi redko povzročijo sistemsko bolezen. Akutna virusna okužba dihal pri otrocih je običajno lahka bolezen in mine v nekaj dneh. Ugotovili so, da izzveni pri četrtini otrok v treh dneh, pri treh četrtinah pa v več kot treh, najkasneje v štirinajstih dneh. Pri 5 % ostanejo težave tudi več kot štirinajst dni po začetku bolezni. V zimskem času so respiratorni virusi odgovorni za več kot polovico vseh obiskov bolnih otrok v urgentni ambulanti in za slabo polovico sprejemov v bolnišnico (Stralioto in sod., 2004). Pogostejše in hujše okužbe dihal imajo otroci, ki živijo v onesnaženem okolju. Otroci z astmo in tisti s pozitivno družinsko anamnezo za alergične bolezni imajo ob virusni okužbi pogosteje prizadeta spodnja dihala (van Benten in sod., 2005; Murray in sod., 2004). Akutna virusna okužba spodnjih dihal se najpogosteje klinično izrazi kot akutni bronhilitis. Otroci običajno zbolijo s prehladnimi znaki in blago povišano telesno temperaturo. Kmalu za tem se pojavijo znaki povečanega dihalnega napora. Otroci pričnejo dihati hitreje, neobičajno sunkovito, "s trebuščkom". Ob tem otrokom v prsih piska. Oteženo dihanje običajno traja 2 do 3 dni. Bolezen mine v enem tednu, vendar lahko otroci za tem še nekaj tednov dražeče kašljajo. V primeru težjega poteka bolezni, ko se pokažejo znaki dihalne nezadostnosti, je potrebno zdravljenje v bolnišnici. Pri nekaterih otrocih se epizode piskanja v prsih ponavljajo. Kar tretjini otrok do tretjega leta starosti v prsih piska ob prebolevanju respiratornih okužb, vendar jih ima po šestem letu starosti le nekaj več kot desetina astmo. Opredelitev osnove hudih ponavljajočih epizod piskanja v prsih pri majhnih otrocih je zahtevna. Raziskave kažejo, da se kronično vnetje dihalnih poti lahko razvije že v zgodnjem otroštvu, vendar se njegove značilnosti bistveno razlikujejo od astmatskega vnetja dihal pri starejših otrocih in odraslih (Martinez, 1995; Maček in sod.,

1994). V nekaterih študijah so prišli do zaključkov, da lahko nekateri virusi perzistirajo v spodnjih dihalih bolnikov s skrajno neugodnim potekom bolezni še več let po prvi epizodi akutnega bronhiolitisa in tako prispevajo k nastanku obstruktivne pljučne bolezni (Maček in sod., 1994). Drugi temu nasprotujejo in menijo, da so za to odgovorni drugi patogenetski mehanizmi (Pichler in sod., 2001).

Najpogostejši povzročitelji akutne virusne okužbe dihal so respiratorni sincicijski virus, človeški metapneumovirus, virus influence, adenovirus, koronavirus, rinovirus, virus parainfluence in enterovirus (Simoes in Rieger, 1999).

Danes lahko etiologijo bolezni dokažemo z novimi, bolj občutljivimi in visoko specifičnimi molekularnimi metodami za dokaz respiratornih virusov. Kljub temu etiologija ostane v 20 – 30 % nepojasnjena. Dokaz virusa je odvisen od bolnika, od bolezni, od sezone v letu in od razpoložljivih diagnostičnih metod. Verjetnost, da bomo dokazali virus je toliko večja kolikor hujša je klinična slika. Rezultat je izjemoma pozitiven še 30 dni po začetku akutne okužbe. Na Nizozemskem so z metodo RT-PCR (angl.: reverse transcription-polymerase chain reaction) ugotovili viruse pri 87 % hospitaliziranih otrok z akutno okužbo dihal. Z metodo PCR lahko tako ugotovimo virusno etiologijo 2-krat pogosteje kot z dokazom antigena s hitrimi metodami in/ali kulturo, saj je le-ta veliko bolj občutljiva in specifična (Jennings in sod., 2004; Kusel in sod., 2006).

1.1 NAMEN DELA

Tudi v Sloveniji so okužbe dihal najpomembnejši vzrok za obisk otrok pri zdravniku. Obolevnost je največja v hladnejšem delu leta, od novembra do marca. Najpogosteje so prizadeti otroci, mlajši od štirih let. Obstruktivna pljučna bolezen predstavlja resno oviro za normalen razvoj otroka. Povzročitelji tega stanja so najverjetneje virusi. Klinične materiale teh otrok navadno pregledamo z neposredno imunofluorescenco, ki je hitra, vendar slabše občutljiva metoda. Zato bi bilo potrebno te materiale preiskati z natančnejšimi metodami, npr. s PCR. Namen diplomskega dela je bil, da s kvalitativnim PCR ugotovimo DNA ali RNA nekaterih respiratornih virusov v kužninah iz zgornjih in spodnjih dihal otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Določali smo DNA adenovirusov in RNA rinovirusov ter metapneumovirusa.

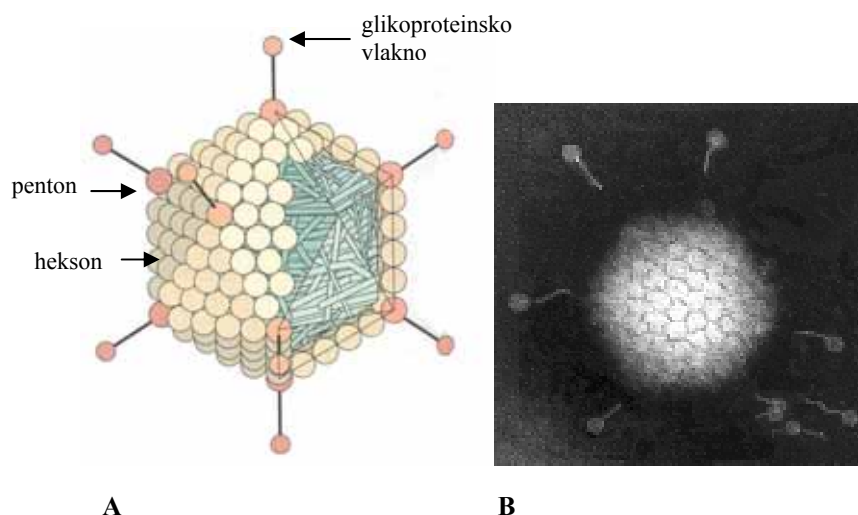
2 PREGLED OBJAV

2.1 ADENOVIRUSI

Adenovirusi (Adv) so virusi z DNA brez ovojnice. Spadajo v družino *Adenoviridae*. Prvič so jih osamili leta 1953 iz tonzil bolnika. Do danes je bilo odkritih 51 serotipov, ki povzročajo bolezni pri človeku. Razvrščeni so v 7 vrst (A, B1, B2, C, D, E, F). Bolezni, ki jih povzročajo, so odvisne od posameznega serotipa. Najpogostejše so okužbe dihal, oči, sečil in prebavil (Brooks in sod., 2001a; Avellòn in sod., 2001; Murray in sod., 2002a).

2.1.1 Morfologija in struktura

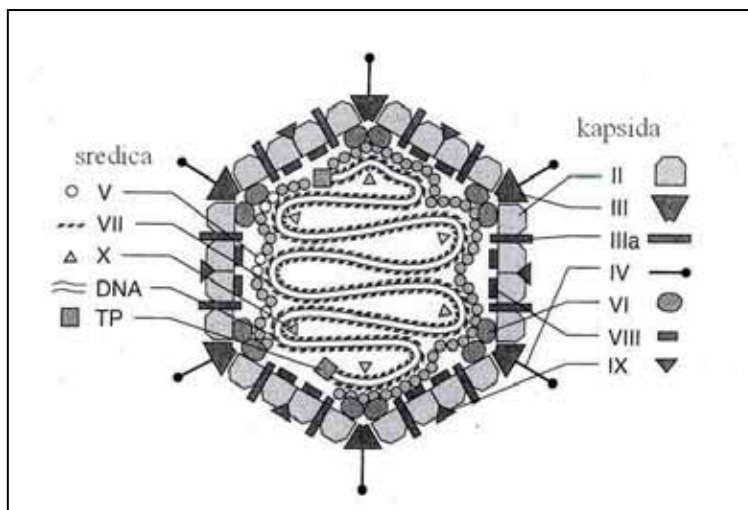
Adv so brez ovojnice in imajo ikozaedrično kapsido s premerom od 70 do 90 nm. Molekulska masa je 20 do 25 x 10⁶. Vsebujejo 87 % proteinov in 13 % DNA. Kapsida je sestavljena iz 252 kapsomer, med katerimi je 240 heksonov in 12 pentonov. Vsak hekson je obdan s šestimi heksoni, vsak penton pa s petimi heksoni. Na pentone so nekovalentno vezana glikoproteinska vlakna, ki so pomembna za pripenjanje virusov na celice in lahko delujejo kot hemaglutinini (Slika 2.1). Ker imajo pentoni z vlakni antigenske komponente, so pomembni za klasifikacijo virusov in diagnozo bolezni (Murray in sod., 2002a).



Slika 2.1: Zgradba adenovirusov (Murray in sod., 2002a: 468)

- A) Model adenovirusnega viriona z glikoproteinskimi vlakni.
- B) Elektronsko mikroskopska slika adenovirusnega viriona z glikoproteinskimi vlakni.

V kapsidi se nahaja nukleokapsidni kompleks iz polipeptidov V in VII ter DNA s 33 – 45 kb pari (Slika 2.2). Genom je linearna molekula dvojnovijačne DNA (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).



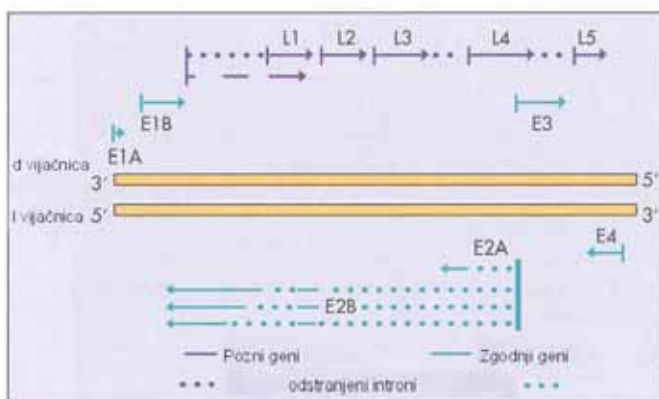
Slika 2.2: Prikaz polipeptidov kapside in nukleokapsidni kompleks iz polipeptidov V in VII ter DNA (Brooks in sod., 2001a: 376)

2.1.2 Razmnoževanje

Pomnoževanje Adv poteka dobro le v epiteljskih celicah (Brooks in sod., 2001a). Virus se z glikoproteinskim vlaknom veže na celični receptor CAR (angl.: coxsackievirus and adenovirus receptor), nato pa z endocitozo vstopi v gostiteljsko celico. Podvojevanje in prepisovanje virusne DNA poteka v jedru, kjer virus tudi dozoreva. Virusni proteini nastanejo s prevajanjem informacijske RNA (mRNA, angl.: messenger RNA) v citoplazmi (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

Pri pomnoževanju Adv ločimo zgodnjo in pozno fazo prepisovanja virusnega genoma (Slika 2.3) (Brooks in sod., 2001a). Zgodnji proteini so regulacijski in encimski. Regulacijski proteini preprečijo podvojevanje celične DNA in sintezo celičnih beljakovin, encimski pa sprožijo pomnoževanje virusne DNA. Po končanem pomnoževanju virusne DNA se pod njenim nadzorom sintetizirajo pozni proteini. Gre za strukturne proteine (komponente kapside) in regulacijske proteine, ki prekinejo sintezo zgodnjih proteinov

(Koren in Marin, 2002). Strukturni proteini nato potujejo v jedro celice, kjer poteka sestavljanje (Murray in sod., 2002a).



Slika 2.3: Poenostavljena mapa genoma adenovirusov (Brooks in sod., 2001a: 378)

Geni se prepisujejo iz obeh vijačnic (l in d). Po prepisu zgodnjih genov iz 4 promotorskih sekvenc nastanejo številne mRNA. Vsi pozni proteini pa se prepisujejo iz 1 promotorske sekvence. Cepitev primarnih prepisov RNA privede do popolnega repertoarja virusnih proteinov. Princip cepitve je prikazan za prepis E2. E = zgodnji protein, L = pozni protein.

2.1.3 Patogeneza

Adv lahko povzročijo litično (mukoepiteljske celice), latentno (nosnožrelno limfno tkivo in druga limfna tkiva) okužbo in maligno preobrazbo celic glodalcev. Večinoma povzročajo lokalne okužbe sluznice dihal, črevesja in oči. Sistemska okužba je redka in je značilna predvsem za imunsko pomanjkljive bolnike (Murray in sod., 2002a).

Toksičnost pentonov zavira transport celične mRNA, sintezo proteinov, povzroči celično zaokroževanje in poškodbe tkiva. Virus se v latentnem stanju nahaja v limfoidnem tkivu, v tonzilah, v Peyerjevih polojih in se lahko reaktivira ob poslabšanem imunskem sistemu bolnika. Nekateri Adv (A, B) lahko v kulturi maligno preobrazijo celice glodalcev, ni pa dokazano, da virusi povzročajo malignome pri ljudeh (Murray in sod., 2002a).

Okužene celice so povečane, v jedrih imajo vključke iz virusne DNA in proteinov. Spremembe so podobne tistim, ki jih povzroča citomegalovirus (Murray in sod., 2002a). Na mestu okužbe so vidni infiltrati mononuklearnih celic in nekroza epiteljskih celic (Brooks in sod., 2001a).

Številni zgodnji proteini pomagajo virusu, da se izogne imunskemu odzivu gostitelja. Med virusnim podvajanjem nastajajo kratki segmenti RNA (VA RNA, angl.: virus-associated), ki nudijo zaščito pred protivirusnim odzivom z interferoni. Poleg tega nekateri proteini onemogočajo lizo okuženih celic s strani gostitelja, saj preprečijo predstavitev antigena citotoksičnim celicam T in aktivacijo vnetja z dejavnikom tumorske nekroze (TNF, angl.: tumor necrosis factor) (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

2.1.4 Imunost proti adenovirusom

Adv sprožijo učinkovito in dolgotrajno imunost, ki se kaže v nastanku nevtralizirajočih protiteles. Le-ta so specifična za posamezen serotip virusa. Tako lahko preprečijo ponovno okužbo z istim serotipom, vendar pa ne preprečijo okužbe z drugimi serotipi. Celično posredovana imunost je zelo pomembna za omejevanje virusov, zato so za osebe s poslabšanim imunskim sistemom značilne ponavljajoče okužbe (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

Materina protitelesa navadno zaščitijo dojenčke pred hudimi respiratornimi okužbami, ki jih povzročajo Adv. Pri več kot 50 % dojenčkov, starih od 6 do 11 mesecev, so našli nevtralizirajoča protitelesa proti enemu ali več serotipom. Zdrave odrasle osebe imajo namreč protitelesa proti številnim serotipom. Nevtralizirajoča protitelesa proti serotipom 1, 2 in 5 se pojavijo pri 40 do 60 % posameznikov starih, od 6 do 15 let, protitelesa proti serotipom 3, 4, 7 so manj pogosta (Brooks in sod., 2001a).

Skupinsko specifična protitelesa so drugačna, saj niso zaščitna, oslabijo s časom in ne prepoznajo serotipov, ki so povzročili predhodne okužbe (Brooks in sod., 2001a).

2.1.5 Epidemiologija

Adv so razširjeni po vsem svetu (Pring-Åkerblom in sod., 1999; Murray in sod., 2002a). Okužbe se pojavljajo vse leto z vrhom v zimskih mesecih. Prenašajo se s človeka na človeka z dotikom, kapljično z dihalnimi izločki in z zaužitjem (fekalno-oralno). Odporni so proti sušenju, detergentom in izločkom prebavnega trakta (kislina, proteaza, žolč) (Murray in sod., 2002a). Po okužbi se lahko še dalj časa izločajo iz žrela z nosnožrelnimi izločki, pomembno pa je tudi izločanje z iztrebki (Aberle in sod., 2003). Večina okužb

poteka brez kliničnih znakov in izzvenijo same po sebi. Najpogosteje povzročajo obolenja serotipi od 1 do 7 (Murray in sod., 2002a).

Adv so v 5 – 10 % vzrok za okužbo zgornjih dihal pri dojenčkih in malih otrocih (Shike in sod., 2005). Te okužbe povzročajo serotipi 1, 2, 5 in 6 (Murray in sod., 2002a). Čeprav Adv povzročajo le 2 – 5 % vseh respiratornih okužb v populaciji, pa so le-te zelo pogoste med vojaškimi novinci. Pripisujejo jih serotipom 3, 4, 7, 14 in 21. Okužbe oči se lahko prenašajo na različne načine, vendar je najpomembnejši prenos z rokami. V poletnih mesecih so pogosti izbruhi bazenskega konjunktivitisa, ki ga navadno povzročata serotipa 3 in 7. Serotip 8 povzroča resnejši epidemični keratokonjunktivitis. Leta 1941 se je bolezen razširila iz Avstralije do havajskih otokov, vse do obale Pacifika. Predvsem so okužbe širili ladjedelniški delavci. Od tod tudi izvira ime bolezni "ladjedelniško oko". Nedavno sta epidemijo epidemičnega keratokonjunktivitisa povzročila tudi serotipa 19 in 37. Pogostnost Adv okužb pri bolnikih s pomanjkljivim imunskim sistemom je približno 5 do več kot 20 %. Višja je pri otrocih kot pri odraslih. Razširjenost serotipov pri bolnikih po transplantaciji je enaka tistim v zdravi populaciji, le da so bolezni resnejše. Bolniki lahko razvijejo sistemske okužbe, ki so lahko usodne. Navadno gre pri teh bolnikih za reaktivacijo virusa, čeprav je pri otrocih lahko vzrok tudi primarna okužba. Serotipa 40 in 41 sta predvsem povezana z gastroenteritisom pri dojenčkih. Prenašata se fekalno – oralno, pojavljata pa se endemično po vsem svetu (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

2.1.6 Bolezni in klinični znaki

Večinoma povzročajo okužbe pri otrocih, manj pogosto pa se pojavljajo med odraslimi. Prevladujejo bolezni dihal, lahko pa virusi okužijo tudi druge organe, predvsem oči in prebavila (Murray in sod., 2002a). Pomembno je vedeti, da lahko posamezen serotip povzroči različne bolezni, nasprotno pa lahko različni serotipi povzročijo enake klinične znake (Brooks in sod., 2001a). Posamezne serotipe in bolezni prikazuje preglednica 2.1.

Preglednica 2.1: Bolezni, ki jih povzročajo adenovirusi (Brooks, 2001a: 381)

vrsta	serotipi	bolezen
A	12, 18	ni simptomov
	31	redko gastroenteritis pri majhnih otrocih
B	3, 7, 14	faringokonjunktivalna vročica
	3, 7, 14, 21	akutne bolezni dihal
	3, 7	pljučnica, akutni febrilni faringitis pri majhnih otrocih
	11, 21	akutni hemoragični cistitis
	34, 35	pljučnica, ki vodi v razsejano bolezen
C	1, 2, 5, 6	akutni febrilni faringitis pri majhnih otrocih; latentna okužba v limfatičnem tkivu
	1, 2, 5	hepatitis pri otrocih s transplantacijo jeter
D	8, 19, 37	epidemični keratokonjunktivitis
E	4	akutne bolezni dihal z vročino, pljučnica
F	40, 41	gastroenteritis

2.1.6.1 Okužbe dihal

2.1.6.1.1 Okužbe dihal pri otrocih

Večina otrok se v zgodnjem otroštvu sreča z enim ali več serotipi Adv. Prekuženost otrok do 5 leta starosti z enim od serotipov Adv je 70 – 80 % (Aberle in sod., 2003). Te okužbe so navadno mile in minejo same po sebi. Vrh okužbe je med 6. mesecem in 5. letom starosti (Chuang in sod., 2003). Okužbo dihal povzročajo najpogosteje serotipi 1, 2, 5 in 6 iz vrste C, serotipa 3 in 7 iz vrste B in serotipi iz vrste E (Schmidtz in sod., 1983).

Adv povzročajo nahod, konjunktivitis, faringitis, tonzilitis, bronhitis, bronhiolitis, pljučnico. V 5 – 10 % so vzrok za akutno okužbo zgornjih dihal pri dojenčkih in malih

otročih. V 4 – 10 % povzročajo okužbo spodnjih dihal. V 8 % so vzrok za hospitalizacijo v enoti za intenzivno zdravljenje (EIZ) otrok s pljučnico in bronhiolitisom, ki so mlajši od 7 let. Za okužbo je značilno hitro klinično slabšanje, potek bolezni in laboratorijski izvidi krvi pa so podobni bakterijski okužbi. Smrtnost zaradi okužbe z Adv pri teh otrocih je 25 % (Stralio to in sod., 2004; Shike in sod., 2005).

Adv se lahko več mesecev ali let po nastopu simptomov izločajo z iztrebki. Ta značilnost je lahko tudi vzrok za endemično pojavljanje virusa med otroki. Serotipi 1, 2, 5 in 6 lahko perzistirajo v limfoidnem tkivu in tonzilah (Brooks in sod., 2001a; Pring-Åkerblom in sod., 1999).

Adv povzroča faringitis pri 48 % otrok, ki so mlajši od 2 let, pri 39 % tistih, ki so stari 2 do 5 let in pri 13 % šolarjev. Skoraj vsi okuženi otroci imajo povišano telesno temperaturo nad 39 °C in vnetje tonzil. Polovica bolnikov ima gnojne obloge. Pojavi se tudi izcedek iz nosu, kašelj, bruhanje, driska, povečane sprednje vratne bezgavke, konjunktivitis, kožni izpuščaji, povečana jetra in povečana vranica (Dominguez in sod., 2005). Če se ob faringitisu pojavi še konjunktivitis, govorimo o faringokonjunktivalni vročici. Pogosteje se ta oblika okužbe pojavlja med starejšimi otroki (Murray in sod., 2002a). Izbruhi so značilni predvsem za poletne taborne (Brooks in sod., 2001a).

Adv je v 29 % vzrok za gnojno angino. Lahko je edini povzročitelj otitisa. Povzroča 4 % vseh otitisov pri otrocih (Putto-Laurila in sod., 1999; Tsolia in sod., 2004).

Adv povzročajo tudi akutno okužbo spodnjih dihal, ki se lahko kaže kot bronhitis, bronhiolitis, krup in pljučnica. Okužba je bodisi posledica neposrednega širjenja virusa iz okuženih zgornjih dihal ali pa posledica viremije. Enainštirideset odstotkov otrok z akutno adenovirozo ima dokazano viremijo, ki traja manj kot 7 dni. Viremijo ima 54 % bolnikov s prvo okužbo in 25 % bolnikov s ponovno okužbo. Ena tretjina otrok z viremijo prebolela okužbo zgornjih dihal, drugi pa okužbo spodnjih dihal, od tega 17 % bronhitis, 28 % pljučnico in 55 % obstruktivni bronhitis (Aberle in sod., 2003). Otroci, mlajši od 2 let, so dovzetnejši za hujše primarne okužbe, ki so lahko usodne in imajo dolgoročne posledice na otrokovo zdravstveno stanje (Brooks in sod., 2001a).

Srednje trajanje hospitalizacije pri otrocih, ki so mlajši od 18 let in so okuženi z Adv, je 2 dni. Pri okužbi spodnjih dihal je hospitalizacija daljša. Povprečna starost hospitaliziranih otrok je 12 mesecev. Šolarji so redko hospitalizirani zaradi okužbe z Adv (Rocholl in sod., 2004; Aberle in sod., 2005). Rocholl in sod. (2004) so ugotovili, da je primarni vzrok za sprejem v bolnišnico dihalna stiska ali hipoksija. Več kot četrtina otrok potrebuje umetno predihavanje.

Sočasno okužbo z Adv in respiratornim sincicijskim virusom (RSV) ter Adv in rinovirusom ima 14 in 17 % bolnikov. Otroci z dvojno okužbo so mlajši, hospitalizacija pa je daljša kot pri enojni okužbi (Aberle in sod., 2005).

2.1.6.1.2 Akutne dihalne bolezni pri vojaških novincih

Akutne dihalne bolezni pri vojaških novincih najpogosteje povzročata serotipa 4 in 7, pomembni pa so tudi serotipi 3, 14 in 21 (Echavarria in sod., 2002). Simptomi so vročina, slabost, boleče grlo in kašelj. Zaplet okužbe je pljučnica, ki se razvije v 10 %. Med zdravimi odraslimi civilisti so te okužbe manj pogoste, visoka stopnja obolevnosti pa se pojavlja med vojaškimi novinci. Vzroka za to sta razmeroma velika skupnost in težke fizične vaje (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

2.1.6.2 Okužbe oči

Folikularni konjunktivitis (vnetje očesne veznice) se lahko pojavi sporadično ali v obliki izbruhov. Vir takega izbruha so kopalni bazeni. Gre za milo okužbo, ki navadno izzveni sama po sebi in ne povzroča trajnih posledic. Bolezen je lahko tudi eden izmed simptomov faringokonjunktivalne vročice (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

Resnejša bolezen je epidemični keratokonjunktivitis. Gre za zelo kužno bolezen, ki se kaže kot akutni konjunktivitis z bolečinami, površinskim pikčastim vnetjem roženice ter motnjami vida, ki lahko trajajo več let (Brooks in sod., 2001a). Rečemo ji tudi "ladjedelniško oko", saj se je v letih 1941 in 1942 pojavilo več kot 10.000 primerov te bolezni med delavci v pomorskih ladjedelnicah pristanišča Pearl Harbour (Murray in sod., 2002a).

2.1.6.3 Okužbe prebavnega trakta

Adv so najpogostejši povzročitelji akutnega virusnega gastroenteritisa; v 15 % predstavljajo vzrok za nastanek gastroenteritisa pri hospitaliziranih bolnikih. Serotipa 40 in 41 povzročata tudi diareje pri dojenčkih. Zelo redko povzročijo vročino in simptome, ki so značilni za okužbo dihal (Murray in sod., 2002a).

2.1.6.4 Druge okužbe

Adv lahko povzročijo tudi oslovskemu kašlju podobno bolezen, akutni hemoragični cistitis z disurijo in hematurijo, okužbe kože in spolovil (Murray in sod., 2002a).

2.1.6.5 Okužbe pri imunsko pomanjkljivih osebah

Imunsko pomanjkljivi bolniki predstavljajo rizično skupino za resne Adv okužbe. Le-te vključujejo pljučnico in hepatitis. Do okužbe lahko pride ob reaktivaciji virusa ali pa gre za zunanji izvor (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

2.1.7 Laboratorijska diagnostika okužb z adenovirusi

Okužbo z Adv potrdimo z neposrednim dokazom virusa ali z dokazom specifičnih protiteles pri bolniku. Imunodetekcija antigena je slabše občutljiva metoda. Bolj občutljiva metoda je osamitev virusa na celični kulturi. Najboljša preiskava za dokaz akutne okužbe dihal je PCR, ker dokazujemo DNA virusa v žrelu, krvi in/ali seču. Z novejšo metodo PCR lahko dokažemo vseh 51 serotipov Adv (Vabret in sod., 2004; Shike in sod., 2005).

2.1.7.1 Dokazovanje virusa na celični kulturi

Za osamitev Adv so najprimernejše celične kulture iz embrionalnih človeških ledvic, ki pa so težko dostopne. Zato se pogosteje uporablja trajne celične linije, kot so HeLa (trajna linija humanih celic karcinoma vratu maternice), HEp-2 (trajna linija celic humanega karcinoma grla). Po 2 do 20 dneh virus povzroči litično okužbo z značilnimi vključki v celicah (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a). Hitrejši način dokazovanja virusa predstavlja metoda "shell vial". Celice gojimo na stekelcih v posebnih posodicah. Po inokulaciji kužnine na celično kulturo sledi centrifugiranje, s katerim virusom "olajšamo"

vstop v celice. Po 48- in 72-urni inkubaciji z označenimi monoklonskimi protitelesi določamo virusni antigen.

2.1.7.2 Detekcija virusnih antigenov neposredno v kužnini

Imunodetekcija antigena (posredna, neposredna imunofluorescenca) je slabše občutljiva metoda (Shike in sod., 2005). Kljub temu pa jo v diagnostičnih laboratorijih veliko uporabljajo, saj dobimo rezultate v manj kot 4 urah; metoda je ponovljiva in ni draga (Rocholl in sod., 2004).

2.1.7.3 Dokazovanje nukleinske kisline

Čeprav je izolacija Adv na celični kulturi visoko občutljiva in ostaja zlati standard, pa ni primerna za diagnostiko. Je namreč dolgotrajna, lahko pa se tudi zgodi, da pride do kontaminacije celičnih kultur z bakterijami in glivami. Sedanja diagnostika se vedno bolj nagiba k PCR. Omogoča hitrejšo določitev virusne DNA kot osamitev na celični kulturi, hkrati pa je bolj občutljiva (Avellòn in sod., 2001; Rocholl in sod., 2004). Za dokaz Adv so v diagnostičnih laboratorijih razvili številne različice metode PCR, ki temeljijo na uporabi začetnih oligonukleotidov, ki se prilegajo na ohranjene dele genov za hekson, VA RNA in DNA polimerazo (DPol) (Allard in sod., 1990; Kidd in sod., 1996; Morris in sod., 1996; Raty in sod., 1999; Brooks in sod., 2001a; Avellòn in sod., 2001; Vabret in sod., 2004; Chmielewicz in sod., 2005) Večinoma gre za kvalitativne teste, kot so npr. enostopenjski PCR in dvostopenjski nested-PCR, ki temelji na uporabi zunanjih in notranjih začetnih oligonukleotidov (Avellòn in sod., 2001; Chmielewicz in sod., 2005). Po končani reakciji dobimo pozitiven ali negativen rezultat. Na tržišču so že komercialni kompleti, ki omogočajo identifikacijo "pozitivnega" vzorca do vrste s specifičnimi sondami (Vabret in sod., 2004). Lee in sod. (2005) so razvili enostopenjski "multiplex" PCR, ki zajame vse serotipe in uspešno loči med serotipoma 3 in 7. V zadnjem času so razvili še bolj izpopolnjeno metodo za določanje virusne DNA. To je kvantitativni PCR v realnem času (real-time PCR, angl.: real-time polymerase chain reaction), pri katerem poteka sočasno pomnoževanje in detekcija virusnega genoma z označeno molekulsko sondo. Chmielewiczova in sod. (2005) pa so naredili korak naprej. Razvili so namreč PCR v realnem času, ki omogoča identifikacijo posameznih vrst v manj kot dveh urah.

2.1.7.4 Serološke preiskave

Okužba povzroči nastanek protiteles, uperjenih proti skupinskim antigenom. Sam test za dokaz protiteles je enostaven, svežo okužbo pa dokažemo z najmanj 4-kratnim porastom titra protiteles med akutno in rekonvalescentno fazo (Brooks in sod., 2001a; Avšič Županc, 2002). Problem seroloških preiskav je, da nam lahko dajo lažno pozitivne rezultate zaradi predhodnih okužb. Možni so tudi lažno negativni rezultati pri bolnikih, ki so imunsko pomanjkljivi in ne razvijejo ustreznega protitelesnega odziva (Avellòn in sod., 2001). Za določanje posameznega serotipa sta najprimernejši metodi inhibicija hemaglutinacije in nevtralizacijski test. Slednja je tehnično zahtevna in dolgotrajna, zato se v vsakodnevni diagnostiki ne uporablja vendar pa je učinkovita za določanje specifičnih protiteles proti posameznim serotipom (Avšič Županc, 2002).

2.1.7.5 Diagnostika enteričnih adenovirusov (serotip 40 – 42)

Za diagnostiko enteričnih serotipov so najprimernejše metode PCR, encimskoimunski metoda (ELISA, angl.: enzyme-linked immunosorbent assay) in elektronska mikroskopija (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

2.1.8 Zdravljenje okužb, ki jih povzročajo adenovirusi

Zdravljenje bolnikov je podporno. Pri otrocih z oslABLJENO odpornostjo in sistemsko okužbo z Adv preizkušajo učinkovitost ribavirina, cidofovirja in ganciklovirja (McCarthy in sod., 1995; Shetty in sod., 2000; Krilov in sod., 2005). S proučevanjem učinkovitosti ribavirina in cidofovirja za zdravljenje takšnih otrok so Gavin in sod. (2002) prišli do sledečih rezultatov: z intravenskim dajanjem ribavirina sta ozdravela dva otroka od petih, kot neučinkovit pa se je izkazal, če so z zdravljenjem pričeli pozno v poteku okužbe. Zaradi nefrotoksičnosti so cidofovir umaknili iz uporabe.

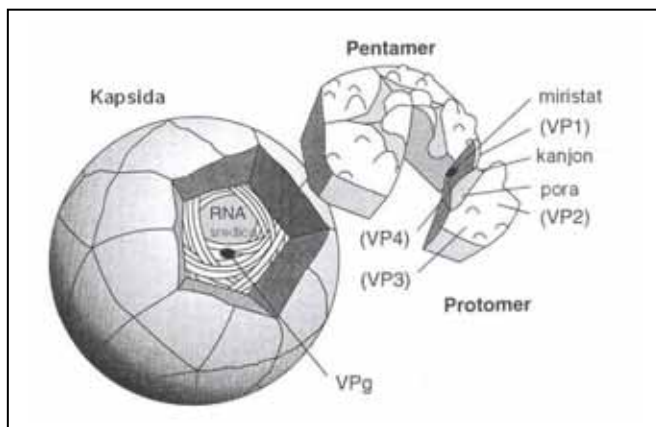
Na tržišču ni cepiva za splošno uporabo, so pa pripravili cepivo proti serotipoma 4 in 7, ki ga uporabljajo za vojake. Gre za živ neoslABLJEN virus, ki se ga daje oralno v obliki želatinastih kapsul. Na ta način se virus izogne dihalom in tako ne more povzročiti okužbe. Sprosti se v črevesju, kjer poteče asimptomatska okužba, zaradi česar se poviša titer protiteles (Brooks in sod., 2001a; Murray in sod., 2002a).

2.2 RINOVIRUSI

Rinovirusi (RV) so RNA virusi, ki spadajo v družino *Picornaviridae*. Znanih je več kot 100 serotipov RV (Murray in sod., 2004). So najpomembnejši povzročitelji prehlada in okužb zgornjih dihal (Murray in sod., 2002b). Postajajo pa tudi vedno bolj pomembni povzročitelji zapletov po presaditvi celic ali organov.

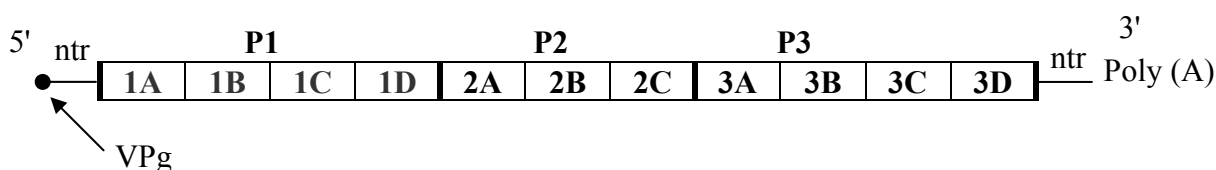
2.2.1 Morfologija in struktura

RV so goli virusi, saj nimajo zunanje lipidne ovojnice. Veliki so od 20 do 27 nm z molekulsko maso $8,5 \times 10^6$. Proteini predstavljajo 70 % virusa, RNA pa 30 %. Imajo ikozaedrično kapsido, ki je sestavljena iz 60 protomerov. Vsak protomer vsebuje štiri različne proteine VP1, VP2, VP3 in VP4. Pet protomerov se povezuje v pentamer, ki predstavlja najbolj stabilno in osnovno enoto virusa. Proteini VP1, VP2 in VP3 se nahajajo na površini. So strukturni proteini, ki predstavljajo glavne antigenske komponente, in so pomembne za vezavo virusa na specifična receptorska mesta gostiteljske celice (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b). VP4 je notranji protein, ki leži med kapsido in virusno RNA. Nastane šele, ko se virus veže na celični receptor (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b). Receptorsko mesto za več kot 80% rinovirusov je ICAM-1 (angl.: intercellular adhesion molecule 1). Ligandi rinovirusov, ki se vežejo na ICAM-1, niso izpostavljeni na virusni površini, ampak ležijo na dnu posebnih kanjonov, ki jih oblikujejo beljakovine virusne kapside VP1, VP2 in VP3 (Slika 2.4) (Koren in Marin, 2002).



Slika 2.4: Zgradba rinovirusov (Brooks in sod., 2001b: 445)

V kapsidi je genom virusa. Gre za linearno enojnovijačno pozitivno polarno RNA s približno 7200 nukleotidi. Genomska RNA ima 3' konec poliadeniliran (poly A), na 5' konec pa je kovalentno vezan polipeptid VPg (Slika 2.5) (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b). Poly A naj bi povečal infektivnost virusa, protein VPg pa naj bi bil pomemben pri vključevanju genoma v kapsido in pri začetku sinteze virusne RNA (Murray in sod., 2002b). Pozitivno polarna RNA deluje kot mRNA in tako neposredno sodeluje pri sintezi virusnih proteinov v gostiteljski celici (Koren in Marin, 2002).



Slika 2.5: Struktura rinovirusne RNA in genetska organizacija poliproteina (Brooks in sod., 2001b: 446)

RNA je urejena 5'-VPg-ntr-poliprotein-ntr-polyA. Ntr pripada regijam, ki se ne prepisujejo. P1, P2 in P3 so prekurzorski proteini, ki jih cepijo virusne proteaze v končne produkte.

2.2.2 Razmnoževanje

Pomnoževanje najbolje poteka v citoplazmi epiteljskih celic zgornjih dihalnih poti. Da pride do pomnoževanja virusa, mora ta vstopiti v gostiteljsko celico. Virus se preko kanjona veže z receptorskim mestom ICAM-1 na gostiteljski celici (Brooks in sod., 2001b). Sledi vstop virusnega delca brez VP4 v celico ter sproščanje RNA (slačenje virusa). Za vstop v celico je potreben transportni mehanizem, ki omogoča prehod polarne RNA preko lipidne membrane celice. Pomembno vlogo pri transportu ima verjetno protein VP4, ki sodeluje tudi pri vezavi na gostiteljsko celico (Levstek, 1998). Virusna RNA se prevede v poliprotein, ki vsebuje proteine plašča in encimske proteine. Virusne proteaze ga cepijo v prekurzorske proteine P1, P2 in P3. S cepljenjem P3 nastanejo od RNA odvisna RNA polimeraza, proteaze in VPg. Šele nato se prične sinteza nove virusne RNA (Brooks in sod., 2001b). RNA polimeraze sintetizirajo negativno polarno RNA, ki služi kot matrica za nastanek novih pozitivno polarnih RNA. Nekatere se vstavljajo v kapsido, druge pa sodelujejo pri nadaljni sintezi virusne RNA (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b). Proteaze cepijo P1 na strukturne proteine VP0, VP1 in VP3. Nato sledi sestavljanje virusa iz slednjih proteinov v protomere in pentamere ter vstop VPg-RNA v

kapsido. Nastane provirion, ki še ni infektiven, dokler se VP0 ne cepi v VP2 in VP4 (Brooks in sod., 2001b). Virusi se sprostijo iz celice ob njeni lizi (Murray in sod., 2002b).

2.2.3 Patogeneza

RV se najbolje pomnožujejo pri temperaturi 33 °C. Prav zaradi te lastnosti se virusi nahajajo v hladnejšem okolju nosne sluznice (Murray in sod., 2002b). Okužbo lahko prične samo en kužen virusni delec, ko pa je vrh bolezni (2 do 4 dni po izpostavitvi), lahko nosni izločki vsebujejo tudi koncentracije 500 do 1000 kužnih virusnih delcev na mililiter (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b). Virus vstopa skozi nos, usta ali oči in povzroči okužbo zgornjih dihal in žrela. Večinoma pride do virusnega pomnoževanja v nosu. Okužene celice sproščajo bradikinin in histamin, kar povzroči znake prehlada (zamašen nos, nosni izcedek, kihanje, kašljanje, vneto žrelo) (Murray in sod., 2002b).

V različnih študijah so prišli do ugotovitev, da se RV lahko pomnožujejo tudi v celicah spodnjih dihal. Narava okužbe spodnjih dihal je enaka kot pri zgornjih dihalih. RV skoraj ne povzročajo histoloških sprememb, do vnetja pa pride zaradi aktivacije predvnetnih mediatorjev IL-6, IL-8 in RANTES (kemotaktičen citokin za eozinofilce) (angl.: regulated upon activation normal T-cells expressed and secreted) (Papadopoulos in sod., 2000; Rihkanen in sod., 2004; Hayden, 2004).

Kot odziv na okužbo nastane tudi interferon (IFN), ki naj bi omejil napredovanje le-te in prispeva k simptomom (Murray in sod., 2002b). Zanimivo je, da sproščanje citokinov med vnetjem pospeši širjenje nekaterih serotipov. Citokini namreč povišajo izražanje ICAM-1 (Murray in sod., 2002b; Hayden, 2004). Med okužbo virusne RNA ovirajo celične RNA in celično sintezo proteinov. Vse to prispeva k citopatološkemu učinku virusa na celice (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b).

2.2.4 Imunost proti rinovirusom

Imunost proti RV je začasna in zaradi številnih serotipov najverjetneje ne prepreči poznejših okužb. Pri primarni okužbi nastanejo pri večini ljudi sluznična protitelesa IgA, v serumu pa protitelesa IgG. Količina IgA pade zelo hitro, IgG pa se obdržijo v serumu v nižjih koncentracijah še približno 18 mesecev po okužbi. Protitelesa se pojavijo 7 do 21

dni po okužbi, zato nimajo bistvene vloge pri okrevanju. Le-to naj bi imel IFN (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b).

2.2.5 Epidemiologija

Razširjeni so po vsem svetu, vrh okužbe je zgodaj jeseni in pozno pomladi. Prenašajo se na dva načina; z aerosoli ter z okuženimi rokami in okuženimi predmeti. Prevladujoč način širjenja predstavlja neposredni stik med dvema oseba (Brooks in sod., 2001b; Hayden, 2004). Pomembni so tudi asimptomatski prenašalci (Aberle in sod., 2005). Z RT-PCR so odkrili virus pri številnih zdravih otrocih in s tem potrdili prodorno naravo samega virusa v populaciji, ko je le-ta epidemičen (Rakes in sod., 1999; Rihkanen in sod., 2004; Druce in sod., 2005; Lemanske in sod., 2005; Kusel in sod., 2006).

Virusi so zelo stabilni in preživijo več ur na okuženih predmetih. Odporni so na sušenje in detergente, občutljivi pa so na kisle vrednosti pH. Inaktiavcija se začne pri pH vrednosti 6, popolna pa nastopi pri vrednosti pH 3. Optimalna temperatura pomnoževanja je 33 °C in manj (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b).

Zbolijo lahko vsi, pogosteje zbole vajo dojenčki in otroci. Virus se širi znotraj družin. Vanje ga vnašajo večinoma predšolski in šolski otroci. Do okužb drugih družinskih članov, navadno otrok, pride v 30-70 % (Brooks in sod., 2001b).

V sezoni se pojavlja več serotipov, ki lahko povzročijo okužbe, prevladujejo pa novo odkriti. To kaže, da se tudi pri rinovirusu dogaja postopen antigenski odmik (angl.: drift), podobno kot se le-ta dogaja pri virusu influence (VI) (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b).

2.2.6 Bolezni in klinični znaki

RV povzročajo več kot polovico okužb zgornjih dihal pri starejših otrocih in odraslih (Johnston in sod., 1995). So glavni povzročitelji navadnega prehlada in povzročitelji zapletov, ki sledijo okužbam zgornjih dihal, kot sta sinuzitis in otitis. Rezultati kliničnih študij kažejo, da so okužbe z RV drugi najpogostejši povzročitelj pljučnice in bronholitisa pri dojenčkih in malih otrocih (Hayden, 2004). Pri bolnikih z astmo, kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB) ali cistično fibrozo navadno povzročajo

poslabšanje le-teh (Papadopoulos in sod., 2000; Hayden, 2004; Kusel in sod., 2006). Vpleteni naj bi bili v hude okužbe spodnjih dihal pri starejših ljudeh in pri imunsko pomanjkljivih bolnikih (predvsem po presaditvi kostnega mozga), vendar o tem ni veliko znanega (Hayden, 2004).

2.2.6.1 Okužbe otrok z rinovirusom

RV povzročajo 30 – 50 % vseh akutnih okužb dihal pri otrocih, na višku sezone pa tudi do 80% (Murray in sod., 2004; Rihkanen in sod., 2004; Aberle in sod., 2005). V prvih devetih mesecih starosti so najpogostejši vzrok za okužbo dihal in predstavljajo 51 % vseh epizod bolezni (Aberle in sod., 2005).

RV najpogosteje povzročajo prehlad. Začetek bolezni je postopen, praviloma brez vročine, pogosto z zamašenim nosom, smrkanjem in bolečinami pri požiranju. Bolnik običajno ne kašlja in nima izrazitega glavobola ali bolečin v mišicah. Bolezen traja običajno 10 dni (Brooks in sod., 2001b).

Vse več raziskav potrjuje, da so RV pomemben povzročitelj akutne okužbe spodnjih dihal, bronhilitisa in sprožilec astmatičnega napada (Papadopoulos in sod., 2000; Lemanske in sod., 2005; Pitrez in sod., 2005; Kusel in sod., 2006). Pri 11 % otrok z okužbo spodnjih dihal, ki se zdravijo v ambulanti, ugotovimo RV (Aberle in sod., 2005). RV ugotovimo pri 12 – 15 % otrok z okužbo spodnjih dihal, ki se zdravijo v bolnišnici (Lemanske in sod., 2005). RV so drugi najpogostejši vzrok za okužbo spodnjih dihal, takoj za RSV. Predstavljajo 30 do 40 % vseh bronhiolitisov pri dojenčkih (Pitrez in sod., 2005).

Lemanske in sod. (2005) so v raziskavi ugotovili, da ima pri 63 % dojenčkov z RV povzročeno sopenje v prvem letu življenja močan vpliv na kasnejše pojave težkega dihanja. Ali se bodo le-te nadaljevale tudi kasneje v otroštvu, je odvisno predvsem od tega, kako huda je akutna okužba in ne od pogostosti okužb v detinstvu. Zelo verjetna sta dva mehanizma, ki privedeta do ponavljajočega sopenja v zgodnjem otroštvu: ponavljajoče hude virusne okužbe, ki poškodujejo pljuča in prirojen oslavljen protivirusni odziv.

Otroci z obstruktivnih bronhitisom, ki so okuženi z RV, so v primerjavi z otroci, ki so okuženi z RSV, starejši, pogosteje so tahikardni in so imeli piskajoče dihanje v preteklosti.

Večkrat imajo v anamnezi alergične bolezni in v periferni krvi izraženo eozinofilijo (Rakes in sod., 1999; Korppi in sod., 2004; Lemanske in sod., 2005).

Pogoste so sočasne okužbe z drugimi virusi, predvsem z Adv in z RSV. Druce in sod. (2005) so ugotovili, da so RV navzoči v 59 % vseh koinfekcij. Prav tako so dvojne okužbe z RV in RSV dokazali tudi Pitrez in sod. (2005) pri dojenčkih z akutnim bronhiolitisom. Otroci z dvojno okužbo imajo hujši potek bolezni (Pitrez in sod., 2005), čeprav v nekaterih študijah niso našli značilne povezave med koinfekcijo in hujšim potekom bolezni (Andreoletti in sod., 2000; Papadopoulos in sod., 2002). Bolniki z dvojno okužbo se pogosteje zdravijo v bolnišnici kot tisti, ki imajo okužbo, povzročeno z enim virusom.

Pri šolarjih so v 45 % vzrok za virusno pljučnico (Tsolia in sod., 2004). RV je lahko edini povzročitelj otitisa pri otrocih (Rihkanen, 2004).

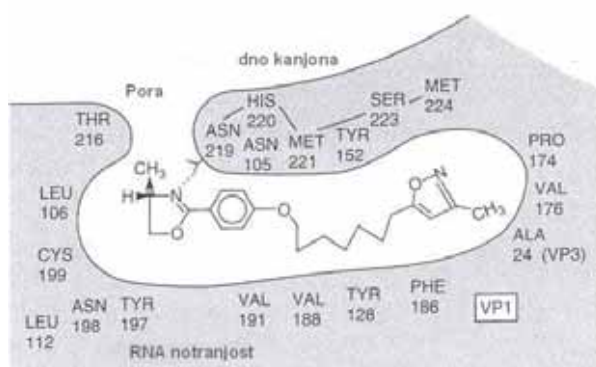
Rihkanen in sod. (2004) so dokazali, da RV perzistira v tkivu tonzil še več tednov po okužbi in ne povzroča kliničnih znakov. Po preboleli okužbi dihal se izloča še pet do šest tednov (Aberle in sod., 2005).

2.2.7 Laboratorijska diagnostika okužb z rinovirusom

RV lahko dokažemo z osamitvijo na celični kulturi na podlagi značilnega citopatskega učinka in nato še z dokazom občutljivosti na kisline. Za diagnostiko okužb je ta metoda manj primerna, saj zahteva do 2 tedna, da dobimo rezultat (Makela in sod., 1998; Rotbart in Hayden, 2000; Steininger in sod., 2001; Murray in sod., 2002b; Loens in sod., 2006). Zaradi številnih serotipov tudi serologija ni primerna (Murray in sod., 2002b). Neposreden dokaz RV v kužnini z monoklonskimi protitelesi še ni možen, saj na tržišču še ni ustreznih. Za dokaz RV v diagnostičnih laboratorijih tako uporabljajo enostopenjsko verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR), ki je občutljiva in razmeroma hitra. Uporabljajo začetne oligonukleotide, ki se prilegajo na visoko ohranjeno 5'-nekodirajočo regijo (5'-NCR, angl.: 5'-noncoding region) med vsemi serotipi RV (Steininger in sod., 2001; Winther in sod., 2006).

2.2.8 Zdravljenje okužb, ki jih povzročajo rinovirusi

Okužbo z RV zdravimo podporno. Preventivno dajanje pirodovirja v nos 6-krat/dan v 85 % prepreči okužbo z RV. Dajanje zdravil 24 ur po inokulaciji virusa v nos nima učinka, skrajša pa izločanje virusa na 3 – 5 dni (Hayden, 2001). Plekonaril zavira pomnoževanje RV, saj se veže v kanjon in tako prepreči vezavo virusa na celični receptor ICAM-1 (Slika 2.6). Izkazal se je kot učinkovit pri preprečevanju okužbe *in vitro* pa tudi *in vivo*. Enviroksim je derivat benzimidazola in upočasnjuje razmnoževanje rinovirusov v celičnih kulturah, saj zavira od RNA odvisno RNA polimerazo. V kliničnih preizkusih se ni preveč izkazal (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b; Anzueto in Niederman, 2003). Pet-dnevno dajanje IFN- α v nos se je izkazalo kot učinkovito pri preprečevanju širjenja RV znotraj družine, vendar lahko njegova dolgotrajna uporaba povzroči še hujše klinične znake kot pa sama okužba z RV. Razvili so tudi zdravilo AG7088, ki je bilo uspešno *in vitro*. Zavira delovanje virusne 3C proteaze, ki je bistvena za virusno pomnoževanje in sestavljanje virusa. V prihodnosti bodo potrebna še številna preizkušanja, da bodo ugotovili ali je AG7088 uporaben tudi *in vivo* (McKinlay, 2001).



Slika 2.6: Vezavno mesto protivirusnega zdravila v VP1 rinovirusov (Brooks in sod., 2001b: 445)

Prikazano protivirusno zdravilo preprečuje vezavo virusa na ICAM-1 zaradi deforamcije dna kanjona.

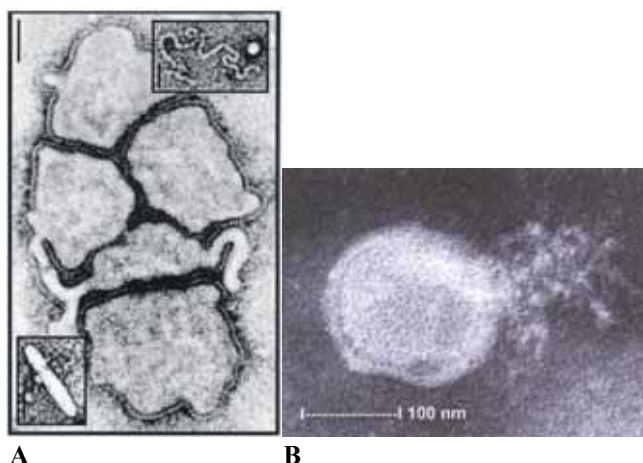
Zaradi številnih serotipov, postopnega antigeneskega odmika in zaradi sprožanja začasnega imunskega odziva, RV ni dober kandidat za razvoj cepiva (Brooks in sod., 2001b; Murray in sod., 2002b).

2.3 ČLOVEŠKI METAPNEVMOVIRUS

Človeški (humani) metapnevmovirus (hMPV) je virus z RNA, ki ga uvrščamo v družino *Paramyxoviridae*, poddružino *Pneumovirinae* in rod *Metapneumovirus*. Prvič so ga osamili leta 2001 na Nizozemskem iz nosnega žrela otrok (van den Hoogen in sod., 2001). Od odkritja pa do danes so hMPV dokazali v kliničnem materialu iz zgornjih in spodnjih dihal bolnikov vseh starosti po vsem svetu (Peret in sod., 2002; Freymuth in sod., 2003; Maggi in sod., 2003). V človeški populaciji kroži že najmanj od leta 1958, saj so protitelesa dokazali v shranjenih serumih otrok in odraslih iz tega leta (van den Hoogen in sod., 2001). Rezultati filogenetskih raziskav kažejo na štiri genske linije: dve glavni liniji A in B, od katerih vsaka vsebuje po dva podtipa (A1, A2 in B1, B2) (van den Hoogen in sod., 2001; Peret in sod., 2002; Maggi in sod., 2003; Hamelin in sod., 2004; König in sod., 2004).

2.3.1 Morfologija in struktura

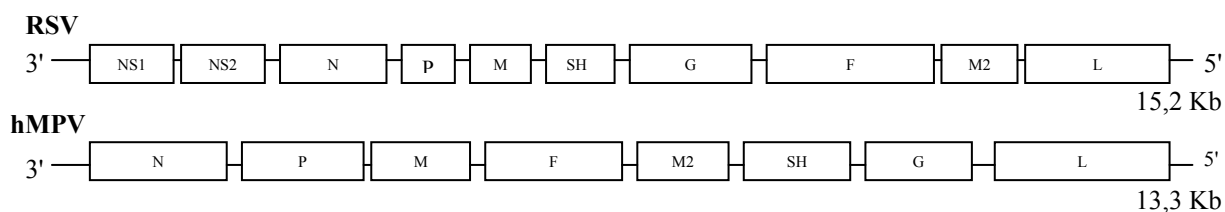
hMPV ima pleomorfno, sferično in filamentozno obliko (Slika 2.7). Ima lipidno ovojnico. V premeru meri od 150 – 600 nm in ima izrazite ovojnične izrastke, dolge med 13 – 17 nm. Premer nukleokapside je 17 nm. hMPV ne kaže hemaglutininske aktivnosti (van den Hoogen in sod., 2001, Peret in sod., 2002, Maggi in sod., 2003).



Slika 2.7: Elektronsko mikroskopska posnetka človeškega metapnevmovirusa (Hamelin in sod., 2004: 984; Alto, 2004:467)

- A) Osrednja slika prikazuje 5 virusov pleomorfnih oblik, slika v desnem zgornjem in levem spodnjem kotu pa filamentozno paličasto obliko virusa.
- B) Slika prikazuje sferično obliko virusa.

Genom je nesegmentirana, enojnovijačna, negativno polarna RNA, dolžine približno 13 kb (van den Hoogen in sod., 2001; Maggi in sod., 2003; Hamelin in sod., 2004). Sestavljen je iz 8 genov, ki kodirajo nukleoprotein (N), fosfoprotein (P), beljakovino matriksa (M), fuzijski protein (F), transkripcijski elongacijski faktor/RNA sintezni regulatorni faktor (M2), majhen hidrofobni protein (SH), glikoprotein za pripenjanje (G) in od RNA odvisno RNA polimerazo (L) (van den Hoogen in sod., 2002). Od vseh človeških virusov je hMPV najbolj podoben RSV, razlikuje se le v vrstnem redu genov in v tem, da nima genov za protein NS1 in NS2, ki ju ima genom RSV na 3' koncu (Slika 2.8) Kljub temu pa je med RSV in hMPV na nivoju nukleinskih kislin le 30 % homolognost (van den Hoogen in sod., 2001; van den Hoogen in sod., 2002).

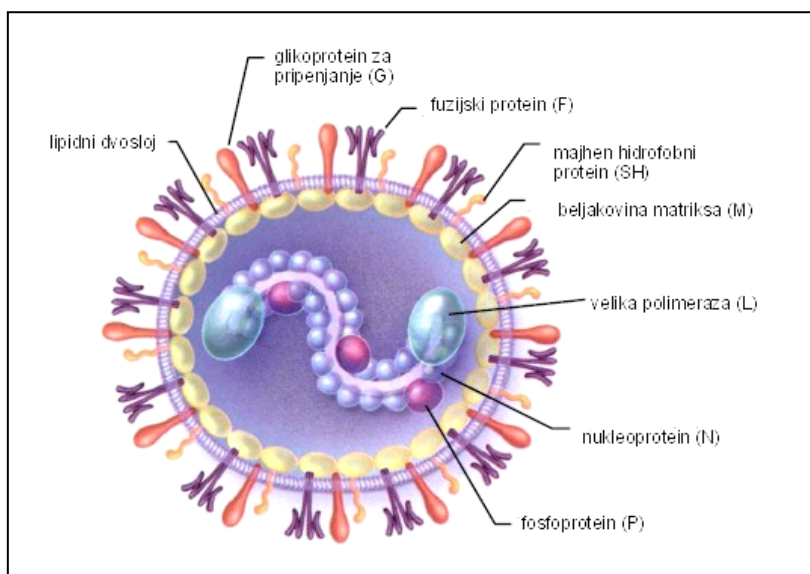


Slika 2.8: Genomska ureditev respiratornega sincicijskega virusa (zgoraj) in človeškega metapneumovirusa (spodaj) (Hamelin in sod., 2004:985)

hMPV je genetsko najbolj podoben RSV. Razlika med njima je le v zaporedju genov in dveh genih za protein NS1 in NS2, ki ju genom hMPV nima. Posamezni geni so označeni z okvirčki.

Funkcija nukleoproteina (angl.: N-nucleoprotein) je zaščita genomske RNA (Bastien in sod., 2003). Fosfoprotein (angl.: P-phosphoprotein) naj bi imel pomembno vlogo bodisi v procesu sinteze RNA ali pri ohranjanju integritete nukleokapsidnega kompleksa (Ling in sod., 1995). Stabilnost sredice viriona zagotavlja beljakovina matriksa (angl.: M-matrix). Leži pod virusno ovojnico in ima afiniteto do nukleokapside in do površinskih glikoproteinov. Pomembna je pri sestavljanju virusnih nukleokapsid s proteini ovojnice. Fuzijski protein (angl.: F-fusion) naj bi bil klasičen fuzijski virusni protein in glavni antigen, ki sproži nevtralizacijo in zaščito proti okužbi s hMPV. Usmerja fuzijo virusne ovojnice s plazmalemo gostiteljske celice, kar je bistveno v začetku infekcije. Omogoča tudi neposredno širjenje virusa, saj je odgovoren tudi za fuzijo na nivoju celica-celica. (Murray in sod., 2002c) Protein M2-1 je bistven za razmnoževanje virusa *in vivo*, M2-2 pa je pomemben pri regulaciji sinteze mRNA (Buccholz in sod., 2005). Za majhen hidrofobni protein (angl.: SH-small hydrophobic) predvidevajo, da je glikoprotein tipa II. Funkcija le-

tega ostaja nepojasnjena. Protein ni bistven za razmnoževanje virusa (Biacchesi in sod., 2003). Glikoprotein za pripenjanje (angl.: G-glycoprotein) je tudi protein tipa II in omogoča vezavo virusa na gostiteljsko celico ter spodbudi protitelesa, da zavirajo vezavo virusa na celične receptorje. Od RNA odvisna RNA polimeraza (angl.: L-large polymerase) je pomembna za pomnoževanje samega virusa (van den Hoogen in sod., 2002). Zgradbo hMPV prikazuje slika 2.9.



Slika 2.9: Zgradba človeškega metapneumovirusa (Boivin, 2005:7)

2.3.2 Razmnoževanje

Razmnoževanje hMPV je omejeno na celice zgornjih in spodnjih dihal. Da bo prišlo do vstopa v celice, se mora virus vezati na sialoglikoproteinski ali glikolipidni receptor gostiteljske celice. To naredi z ovojničnim proteinom za pripenjanje (G). Fuzijski protein (F) posreduje fuzijo virusne ovojnice s plazemsko membrano gostiteljske celice in tako omogoči vstop virusa v celico. Beljakovina F se aktivira šele ob razcepu na F1 in F2, kar omogoči zunajcelična proteaza. Povzroči tudi zlitje membran okuženih in neokuženih celic, to pa omogoči neposredni prehod virusov iz celice v celico. Sedaj beljakovino F cepijo znotrajcelične proteaze. Slačenje virusa se začne ob zlitju s celično membrano, nato se nukleokapsida sprosti neposredno v celico. Od RNA odvisne RNA polimeraze prepisujejo enovijačno, negativno polarno RNA v več pozitivno polarnih RNA, od katerih je vsaka

monocistronska mRNA in predstavlja posamezen gen. Virusni proteini se sintetizirajo v citoplazmi. RNA polimeraze omogočijo podvajanje virusnega genoma. Najprej sintetizirajo pozitivno polarno RNA, ki je matrica za izdelovanje novih molekul negativno polarne genomske RNA. Virusi izkoriščajo celične poti, po katerih se normalno sintetizirajo membranski in sekrecijski proteini. Dodajanje sladkorjev (glikozilacija ovojničnih proteinov) se zgodi, ko proteini potujejo v veziklih iz grobega endoplazemskega retikuluma v Golgijev aparat in nato do plazemske membrane, v katero se vgradijo na mestih, kjer virusi zapuščajo celice z brstenjem. Virusi se sestavljajo v citoplazmi okuženih celic. Zadnja stopnja v razmnoževanju hMPV je izstopanje iz celice. hMPV, ki ima ovojnico, zapusti celico z brstenjem iz celične površine, pri čemer ostane celica nepoškodovana (Murray in sod., 2002c; Koren in Marin, 2002).

2.3.3 Patogeneza

Z eksperimentalnimi okužbami makakov (*Macaca fascicularis*) so ugotovili, da je hMPV primarni patogen zgornjih in spodnjih dihal. Razmnožuje se v migetaljkastih epiteljskih celicah in manj pogosto v pnevmocitih tipa 1. V okuženih celicah se virus izraža v glavnem na apikalni površini le-teh. Virusni antigen so zaznali tudi v alveolarnih makrofagih, vendar naj bi v tem primeru šlo za fagocitozo in ne za razmnoževanje (Kuiken in sod., 2004). Patogeneza hMPV se kaže v degradaciji in/ali nekrozi epiteljskih celic z okroglimi citoplazemskimi vključki, odgovoru nevtrofilcev, makrofagov in povečani produkciji sluzi. Destrukcija tkiva je lahko tako huda, da nastanejo lokalne krvavitve. Kasnejše stopnje okužbe vključujejo razširitev peribronhiolarnega limfoidnega tkiva, skvamozno metaplazijo, hemosiderin in akumulacijo intraalveolarnih penastih makrofagov. To označuje kronično vnetje dihal in obstrukcijo dihalnih poti (Vargas in sod., 2004). Alvarez in Tripp (2004) sta pri proučevanju okuženih miši BALB/c opazila, da ima hMPV bifazični razmnoževalni vzorec s porastom virusa 7. dan in 14. dan po okužbi. Nasprotno pa Hamelin in sod. (2005) tega niso opazili. Možen vzrok za to je izbira različnega seva, ki lahko vpliva na kužnost in patogenezo.

2.3.4 Imunost proti človeškemu metapneumovirusu

Ni še povsem jasno, kakšen je imunski odziv gostitelja na okužbo. Znotraj družine paramiksovirusov je hMPV najbolj podoben RSV, zato predvidevajo, da je imunski odziv podoben odzivu na okužbo z le-tem. Do sedaj je bilo objavljenih več rezultatov različnih študij, kjer so primerjali imunski odziv na okužbo z RSV in hMPV. Jartti in sod. (2002) so merili količino izločenih kemokinov pri otrocih, okuženih z RSV in hMPV. Ugotovili so, da imajo otroci, okuženi s hMPV, višje koncentracije IL-8 kot pri okužbi z RSV. V kasnejših študijah so pri dojenčkih, okuženih z RSV, v nosnih izpirkih določili 2-6-krat višje koncentracije kemotaktičnih citokinov (IL-8, IL-1 β , TNF- α) kot pri tistih, okuženih s hMPV (Laham in sod., 2004). S proučevanjem miši BALB/c so ugotovili, da je okužba s hMPV povezana s slabim vnetnim odgovorom, ki ga označuje prihod celic T CD4⁺ v pljuča, nizka ekspresija IFN- γ , sprožitev povečane ekspresije IL-10 celic T_H2 v kasnejših fazah okužbe in zapoznena aktivnost citotoksičnih limfocitov T, ki sovпада s perzistentnim virusnim razmnoževanjem v pljučih (Alvarez in Tripp, 2004). To je skladno z ugotovitvijo Lahama in sod. (2004) in s tem, da je infektivni hMPV v pljučih miši BALB/c do 60 dni po infekciji kljub navzočnosti nevtralizacijskih protiteles. RNA hMPV lahko določimo v pljučih še več kot 180 dni po infekciji. Da lahko virus perzistira v pljučih ob navzočih protitelesih, je mogoče možno zaradi antigenškega spreminjanja epitopov, h kateremu lahko prispeva genska raznolikost glikoproteina G hMPV (Alvarez in Tripp, 2004; Hamelin in sod., 2005). V študiji Huckove in sod. (2007) so ugotovili, da povzročča hMPV v primerjavi z RSV hujše bolezni, povezane z visokimi vrednostmi citokinov in kemokinov ter močnejšim odzivom celic NK. To neskladje z nekaterimi prejšnjimi raziskavami so pripisali različnim lastnostim izolatov, uporabljenih v študijah.

hMPV lahko povzroči okužbo kljub obstoječi imunosti. Otroci, mlajši od enega leta, so bili okuženi z virusom, dokazane pa so bile tudi ponovne okužbe. Vzrok za to bi lahko bila nepopolna imunost proti hMPV ali heterogenost hMPV (van den Hoogen in sod., 2004) Pri otrocih se titer protiteles proti hMPV s starostjo dviga (Alto, 2004). Domneva se, da pride do dviga protitelesnega odziva kot posledica ponavljajočih okužb z enakim ali zelo podobnim sevom.

2.3.5 Epidemiologija

hMPV je razširjen po vsem svetu, saj so ga odkrili pri bolnikih v Evropi, Severni Ameriki, Aziji in Avstraliji (McAdam in sod., 2004; Alto, 2004; Hamelin in sod., 2004).

hMPV so dokazali pri bolnikih z akutno boleznijo dihal, starih od 2 mesecev do 87 let (Peret in sod., 2002; Alvarez in Tripp, 2004). S serološkimi preiskavami s posredno imunofluorescenco jim je uspelo dokazati, da ima 25 % otrok, starih med 6 in 12 mesecev, protitelesa proti virusu, v starosti 5 let pa so seropozitivni že skoraj vsi otroci (van den Hoogen in sod., 2001; Alto, 2004). hMPV je drugi najpogostejši povzročitelj okužb dihal pri otrocih, mlajših od enega leta. (Ordás in sod., 2006). Pogoste so tudi okužbe odraslih. Največkrat se okužijo mladi odrasli (do 9 %), kar delno povezujejo z dejstvom, da imajo ti bolj tesne stike z majhnimi otroki (Falsey in sod., 2003). Okužbe s hMPV potekajo brez simptomov pri 1,2 – 4,1 % posameznikov, kar kaže na možnost prikritih okužb (Alto, 2004; Williams in sod., 2004).

Okužba s hMPV se pojavi pozno pozimi in zgodaj spomladi. Pojavi se v epidemiji okužb z RSV in virusom influence (McAdam in sod., 2004; Hamelin in sod., 2004). Rezultati kažejo, da se hMPV v nasprotju z RSV pojavlja v vsakem mesecu v letu (McAdam in sod., 2004; Williams in sod., 2004).

O načinu prenosa okužb s hMPV je še malo znanega, vendar je glede na sorodnost z RSV prenos verjetno podoben prenosu okužbe z RSV, t.j. z neposrednim stikom z okuženimi rokami, ki jih zanesemo v usta ali oči (Mahalingam in sod., 2005). Ker ima hMPV ovojnico, ni odporen na kloroform (van den Hoogen in sod., 2001).

2.3.6 Bolezni in klinični znaki

2.3.6.1 Okužbe otrok s človeškim metapneumovirusom

Simptomi pri obolelih otrocih so zelo podobni tistim, ki jih povzroča RSV. Nekateri imajo le blage znake okužbe zgornjih dihal, vnetje srednjega ušesa, vnetje očesne veznice, drugi pa zbolijo zaradi okužb spodnjih dihal, ki se kažejo kot bronhitis, bronhiolitis, pljučnica (Stockton in sod., 2002; Freymuth in sod., 2003; Alto, 2004; Hamelin in sod., 2004). Klinični znaki in simptomi za RSV in hMPV pri otrocih se praktično ne razlikujejo, vendar

pa so dojenčki, mlajši od enega leta, pozitivni na RSV v 48 % in na hMPV v 11 %, kar kaže na to, da se otroci okužijo s hMPV nekoliko kasneje kot z RSV (Biacchesi in sod., 2003). Klinični znaki in simptomi vključujejo še dispnejo, vročino, kašelj, rinoritis, sopenje. Primarna okužba s hMPV naj bi povzročila najhujše simptome (Alto, 2004), saj za najbolj resnimi obolenji dihalnih poti zbolijo otroci v prvem letu življenja (Williams in sod., 2004).

Pri ambulantno zdravljenih otrocih je hMPV v 12 % vzrok za okužbo spodnjih dihal, takoj za RSV. Približno 4% otrok z okužbo spodnjih dihal se zdravi v bolnišnici. Pri otrocih z bronhiolitisom in pljučnico, ki potrebujejo hospitalizacijo, je vzrok za okužbo v 10%.

V Franciji je v 6,4 % vzrok za prvi akutni bronhiolitis v življenju pri otrocih, ki so mlajši od 24 mesecev, takoj za RSV in RV. Srednja starost okuženih je 4,5 mesecev, trajanje hospitalizacije pa je primerljivo z drugimi virusnimi povzročitelji bronhiolitisa (Crowe, 2004; Bouscambert-Duchamp in sod., 2005).

V Sloveniji so hMPV določili v kužninah iz zgornjih in spodnjih dihal hospitaliziranih otrok. Rezultati raziskave kažejo, da je hMPV eden pomembnejših povzročiteljev okužb dihal tudi pri nas, saj je bil glede pogostnosti okužb (21 %) takoj za RSV pri otrocih, mlajših od 3 let. Pri otrocih, mlajših od 2 mesecev, ga niso določili. Določili so tudi dvojne okužbe s hMPV in RSV, s hMPV in Adv ter s hMPV in VI B (Logar in sod., 2006).

Zelo majhni otroci večkrat potrebujejo sprejem v bolnišnico in umetno predihavanje, podobno kot pri okužbah z RSV (van den Hoogen in sod., 2001). Pri otrocih, ki so mlajši od 3 let in se zdravijo v EIT zaradi akutne okužbe dihal, so ugotovili hMPV pri 1,8 % bolnikov (König in sod., 2004).

Glede na to, da sezoni epidemij RSV in hMPV sovpadata, prihaja do pogostih hkratnih okužb z obema virusoma (König in sod., 2004). Hkratna okužba z RSV ali drugimi virusi dihalnih poti naj ne bi povečala resnosti bolezni (Maggi in sod., 2003; Williams in sod., 2004; Alto, 2004), čemur druge študije nasprotujejo (König in sod., 2004; McAdam in sod., 2004; Laham in sod., 2004). V eni od objavljenih raziskav je bilo dokazano, da je imelo 70 % dojenčkov, ki so potrebovali umetno predihavanje ob prebolevanju akutnega

bronhiolitisa, dvojne okužbe s hMPV in RSV (Greensill in sod., 2003). Dvojna okužba je 10-kratni dejavnik tveganja za sprejem bolnikov v EIZ (Semple in sod., 2005).

hMPV naj bi bil močnejši sprožilec astme v primerjavi z RSV ali virusom influence, oziroma okužba s hMPV naj bi vodila do astme ali kronične bolezni pljuč (Jartti in sod., 2002; Freymuth in sod., 2003; Vargas in sod., 2004). Rawlinson in sod. (2003) tem ugotovitvam nasprotujejo.

hMPV se izloča manj kot 7 dni po preboleli okužbi zgornjih dihal in do 21 dni po začetku okužbe spodnjih dihal. Virusno breme pada s kliničnim izboljšanjem (Sarasini in sod., 2006).

2.3.6.2 Okužbe s človeškim metapnevmovirusom pri odraslih osebah

Raziskave iz Kanade, Velike Briatnije in Združenih držav Amerike dokazujejo, da se okužbe s hMPV pojavljajo tudi pri odraslih bolnikih. Zaradi relativno stabilnih titrov nevtralizacijskih protiteles pri odraslih obstaja domneva, da prihaja pri njih do klinično pomembnih ponovnih okužb, ki večinoma potekajo brez simptomov. Klinična slika pri okuženih odraslih je zelo podobna okužbi z RSV oz. drugimi respiratornimi virusi (zamašen nos, bolečine v žrelu, kašelj, dispneja, piskanje). Večina odraslih brez pridruženih kroničnih bolezni preboli okužbo doma, tisti s kronično pljučno ali srčno boleznijo ter imunsko oslabljeni pa imajo težji in daljši potek in v večjem odstotku potrebujejo bolnišnično zdravljenje (Stockton in sod., 2002; Boivin in sod., 2002; Greensill in sod., 2003; Falsey in sod., 2003; Hamelin in sod., 2004).

2.3.6.3 Okužbe s človeškim metapnevmovirusom pri imunsko pomanjkljivih osebah

Kritični primeri okužb s hMPV so znani pri imunsko pomanjkljivih ljudeh (Alto, 2004). hMPV so določili kot edini patogen mikroorganizem v nosnožrelnem aspiratu pri bolniku s presajenim kostnim mozgom, ki je podlegel bolezni spodnjih dihal. Prav tako je opisano, da je povzročil hud pnevmonitis in dihalno nezadostnost pri 17-letnemu dekletu z akutno limfoblastično levkemijo. Tudi v tem primeru je bila okužba s hMPV usodna (Hamelin in sod., 2004). O okužbah s hMPV poročajo tudi pri otrocih, okuženih z virusom HIV, pri čemer njihov pomen še ni znan (Madhi in sod., 2003).

2.3.7 Laboratorijska diagnostika okužb s človeškim metapneumovirusom

2.3.7.1 Dokazovanje virusa na celični kulturi

Poskus osamitve virusa iz nosnožrelnih izpirkov je bil uspešen na vrsti celičnih kultur: na HEp-2, ki izvirajo iz karcinoma grla in so se pokazale kot najbolj občutljivejše, na MDCK (pasje ledvične celice), na LLC-MK2 (ledvične celice opic rezus) in v zadnjem času tudi na celicah Vero (ledvične celice afriške zelene opice). Dokazovanje hMPV na celični kulturi pa je za diagnostiko okužb manj primerna metoda. Zahteva namreč dolgo inkubacijsko dobo, saj postanejo citopatski učinki, ki jih virus povzroči, vidni šele po mnogih krogih virusnega razmnoževanja in razširitvi virusa na sosednje celice. Citopatski učinek je opazen šele 10 do 22 dni po vcepitvi virusa na celično kulturo. Kaže se kot žarišče zaokroženih celic, ki se s časom odlepajo od podlage (van den Hoogen in sod., 2001; Hamelin in sod., 2004).

2.3.7.2 Dokazovanje nukleinske kisline

Sedanje diagnostične možnosti so bolj ali manj omejene na RT-PCR. Enostopenjska verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) omogoča hitrejšo, bolj specifično določitev virusne RNA kot osamitev virusa na celičnih kulturah, hkrati pa je bolj občutljiva. Za dokaz hMPV v diagnostičnih laboratorijih uporabljajo RT-PCR z začetnimi oligonukleotidi, ki se prilegajo na ohranjene dele genov za nukleoprotein (N), polimerazo (L) in fuzijski protein (F) (Stockton in sod., 2002; Falsey in sod., 2003; Hamelin in sod., 2004). Še bolj izpopolnjena metoda za določanje virusne RNA hMPV je RT-PCR v realnem času, pri kateri sočasno poteka pomnoževanje in detekcija virusne RNA z označeno molekularno sondo. RT-PCR v realnem času še dodatno zmanjša čas diagnostike, saj dobimo rezultate v manj kot dveh urah (Hamelin in sod., 2004). Poleg tega je kvantitativna metoda in 10-krat bolj občutljiva kot RT-PCR. Z njo so učinkovito določili vse štiri genske linije hMPV (Maertzdorf in sod., 2004; Kuypers in sod., 2004).

2.3.7.3 Dokazovanje protiteles

2.3.7.3.1 Posredna imunofluorescenca

Poskusno so v parnih serumih bolnikov dokazovali specifična protitelesa z antigenom, nanešenim na objektna stekelca. Antigen so predstavljale celice LLC-MK2, okužene s hMPV (van den Hoogen in sod., 2001).

2.3.7.3.2 Encimskoimunski test

Do sedaj so za odkrivanje protiteles proti hMPV razvili več različic encimskoimunskega testa ELISA (angl.: enzyme-linked immunosorbent assay). Testi so se med sabo razlikovali po uporabljenem antigenu. To so bile lizirane celice, okužene s hMPV (van den Hoogen in sod., 2001) in rekombinantni nukleoprotein (N) (Hamelin in sod., 2004). Sam test omogoča boljše razumevanje epidemiologije tega virusa, za diagnostiko pa ni primeren. Okužbe s hMPV so v otroštvu zelo razširjene. Če hočemo potrditi svežo okužbo, moramo dokazati serokonverzijo ali najmanj štirikratno povečanje titra protiteles (Avšič Županc, 2002; Hamelin in sod., 2004).

2.3.7.4 Detekcija virusnih antigenov neposredno v kužnini

Neposreden dokaz hMPV v kužnini z monoklonskimi protitelesi (neposredna ali posredna imunofluorescenca) še ni možen, a na tržišču kmalu lahko pričakujemo komercialne komplete. Proizvajalec BioSorin je že ponudil kit, vendar je edina primerna kužnina za neposreden dokaz virusa nosno žrelni izpirek, kar pa je omejitiv.

2.3.7.5 Elektronska mikroskopija

Teoretično tudi elektronska mikroskopija predstavlja diagnostično metodo, a so jo uporabljali predvsem v raziskovalne namene za potrditev virusa v supernatantu celičnih kultur z izraženimi citopatskimi spremembami (van den Hoogen in sod., 2001).

2.3.8 Zdravljenje okužb, ki jih povzroča človeški metapneumovirus

Zaenkrat še ni na voljo cepiva, kemoterapevtikov ali protitelesnih pripravkov za zdravljenje okužb s hMPV. Nedavno pa so Wyde in sod. (2003) pokazali, da imajo ribavirin in imunoglobulini za intravensko dajanje (IVIG), angl.: polyclonal intravenous immunoglobulin) široko protivirusno aktivnost in lahko zavirajo tudi hMPV *in vitro*. Čeprav je ribavirin v kliničnih raziskavah pokazal precejšnjo toksičnost za kostni mozeg in

jetra, ga nameravajo skupaj z IVIG uporabiti za zdravljenje hudih okužb s hMPV pri imunsko pomanjkljivih bolnikih (Englund in sod., 1997; Koren in Poljak, 2002). Proti hMPV je *in vitro* učinkovit tudi cidofovir (Kimberlin, 2005). Znano je, da nova sulfatna sialična lipidna molekula NMSO3 zaviralno deluje na okužbo s hMPV *in vitro*. Deluje tako, da prepreči pripenjanje virusa na gostiteljsko celico ter zaustavi nastajanje sincicijev in sekundarno razširjanje okužbe (Wyde in sod., 2004). Cepiva še ni na voljo, vendar so pripravili rekombinantni virus hMPV, ki mu manjka gen za protein za pripenjanje (G) in predstavlja podlago za učinkovito cepivo v prihodnosti. Pri hrčkih, okuženih s tem virusom, se namreč razmnoževanje virusa zmanjša za 40-krat v spodnjih dihalih in 600-krat v zgornjih dihalih v primerjavi z divjim tipom. Poleg tega pa v hrčkih nastajajo tudi visoki titri nevtralizacijskih protiteles proti hMPV, kar omogoča popolno zaščito proti divjemu tipu virusa (Biacchesi in sod., 2004). Ulbrandtova in sod. (2006) so proizvedli visoko afinitetna monoklonska protitelesa specifična proti fuzijskemu proteinu (F) hMPV, ki so sposobna nevtralizacije virusa tako *in vitro* kot tudi *in vivo* v hrčkih. S tem so nakazali, da bi lahko monoklonska protitelesa uporabili kot preventivo za preprečevanje hudih okužb spodnjih dihal s hMPV v visoko rizični populaciji.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Klinični material

V preiskavo smo vključili 63 kliničnih materialov, odvzetih 34-im bolnikom v različnih časovnih obdobjih. Zajeli smo obdobje od leta 2003 do vključno leta 2005. Bolniki so bili otroci, stari od 4 mesecev do 16 let z diagnozo obstruktivna pljučna bolezen. Klinični material so jim odvzeli ob rednih pregledih na pnevmološkem oddelku Pediatrične klinike v Ljubljani. Kužnine so bile brisi nosnega žrela, aspirati bronhija in bronhoalveolarni izpirki (BAL-i).

3.1.2 Komercialni komplet QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit za osamitev virusne DNA (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija)

Komplet vsebuje:

- proteinazo K,
- pufer AL,
- pufer AW1- koncentrat, ki smo ga razredčili s 66 ml absolutnega etanola (96-100 %),
- pufer AW2- koncentrat, ki smo ga razredčili s 125 ml absolutnega etanola (96-100 %),
- pufer AE,
- plastični pribor.

Za osamitev virusne DNA smo potrebovali še fosfatni pufer (PBS) in absolutni etanol (96-100 %), ki nista v kompletu.

Sestava fosfatnega pufra:

- 85,00 g NaCl
- 44,50 g Na₂HPO₄ x 12H₂O (m.m. 358,14)
- 3,40 g KH₂PO₄
- 10 l destilirane vode (pH: 7,4-7,6)

3.1.3 Komerčni komplet RNeasy® Protect Mini Kit za osamitev virusne RNA (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija)

Komplet vsebuje:

- pufer RW1,
- pufer RPE- koncentrat, ki smo ga razredčili z 220 ml absolutnega etanola (96-100 %),
- pufer RLT,
- ddH₂O – demineralizirana in destilirana voda brez ribonukleazne aktivnosti,
- β-merkaptoetanol,
- plastični pribor.

Potrebovali smo še 70-odstotni etanol, pripravljen iz absolutnega etanola, ki ni v kompletu,

3.1.4 Reagenti za izvedbo PCR

3.1.4.1 "klasični" PCR in nested-PCR za pomnoževanje DNA adenovirusov

Za obe reakciji pomnoževanja odseka DNA Adv smo uporabili enake reagente, a različne začetne oligonukleotide, ki smo jih shranjevali pri temperaturi –20 °C.

Reagenti:

- 10x reakcijski pufer (Roche Applied Science, Basel, Švica),
- mešanica dNTP-jev, konc. 10 mM (Applied Biosystems, ZDA),
- MgCl₂, konc. 25 mM (Roche Applied Science, Basel, Švica),
- Ampli Taq Gold Roche™ polimeraza, konc. 5 U/μl (Roche Applied Science, Basel, Švica),
- ddH₂O- demineralizirana in destilirana voda brez ribonukleazne aktivnosti (GIBCO™, VB, ZDA),
- specifični začetni oligonukleotidi (TIB® Molbiol, Berlin, Nemčija).

3.1.4.2 RT-PCR za pomnoževanje RNA rinovirusov

Za to reakcijo RT-PCR smo uporabili reagente komercialnega kompleta QIAGEN[®] One-step RT-PCR kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija), ki smo jih shranjevali pri temperaturi – 20 °C.

Komplet vsebuje:

- 5x reakcijski pufer,
- mešanico dNTP-jev, konc. 10 mM,
- mešanico encimov optimalne konc.,
- 5x pufer Q,
- ddH₂O – demineralizirana in destilirana voda brez ribonukleazne aktivnosti.

Potrebovali smo še specifične začetne oligonukleotide (TIB[®] Molbiol, Berlin, Nemčija).

3.1.4.3 RT-PCR za dokaz RNA človeškega metapnevmovirusa

Za to reakcijo smo uporabili vse reagente komercialnega kompleta Access RT-PCR System (Promega, Madison, WI, USA), ki smo jih shranjevali pri temperaturi - 20 °C.

Komplet vsebuje:

- 5x AMV/TfI reakcijski pufer,
- mešanico dNTP-jev, konc. 10 mM,
- MgSO₄, konc. 25 mM,
- AMV reverzno transkriptazo, konc. 5 U/μl,
- TfI DNA polimerazo, konc. 5 U/μl,
- ddH₂O – demineralizirana in destilirana voda brez ribonukleazne aktivnosti.

Potrebovali smo še specifične začetne oligonukleotide (TIB[®] Molbiol, Berlin, Nemčija).

3.1.5 Oznake in sosledja začetnih oligonukleotidov (TIB[®] Molbiol, Berlin, Nemčija)

Uporabili smo specifične začetne oligonukleotide za pomnoževanje odseka virusnega genoma Adv, RV in hMPV. Dobili smo jih v liofilizirani obliki z znano maso. Pripravili

smo jih z dodatkom ustrezne količine ddH₂O. Shranjevali smo jih pri temperaturi – 20 °C. Tarčne gene za posamezne viruse in zaporedja nukleotidov prikazujeta preglednici 3.1 in 3.2.

Adenovirusi:

a) par zunanjih začetnih oligonukleotidov za klasični PCR

- Adeno-o-S127144
- Adeno-o-AS127143

b) par notranjih začetnih oligonukleotidov za n-PCR

- Adeno-nest S105995
- Adeno-nest AS105994

Rinovirusi:

a) par zunanjih začetnih oligonukleotidov za RT-PCR

- HRV (hR) RHINO 1 699665
- HRV (hR) RHINO 2 699666

Metapnevmovirus:

a) par zunanjih začetnih oligonukleotidov za RT-PCR

- HMPV1f 559758
- HMPV1r 559759

Preglednica 3.1: Tarčni geni

VIRUS	TARČNI GEN
Adenovirus	hekson
Rinovirus	5' nekodirajoča regija RV tipa 1 B
Metapnevmovirus	fuzijski protein (F)

Preglednica 3.2: Skupinsko specifični začetni oligonukleotidi

VIRUS	ZAPOREDJE		Pričakovana velikost pridelka PCR
Adv	zunanj ON	5'-CAGCACGCCCGGGATGTCAAAGT-3' 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'	300 bp
	notranj ON	5'-TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC-3' 5'-GCCACCGAGACGTACTIONCAGCCTG-3'	142 bp
RV	zunanj ON	5'-CGGACACCCAAAGTAG-3' 5'-GCACTTCTGTTTCCCC-3'	380 bp
hMPV	zunanj ON	5'-CTTTGGACTTAATGACAGATG-3' 5'-GTCTTCCTGTGCTAACTTTG-3'	450 bp

Legenda:

Adv- adenovirus

RV- rinovirus

hMPV- človeški metapneumovirus

ON- začetni oligonukleotid

3.1.6 Material za izvedbo elektroforeze v agaroznem gelu za dokaz pridelkov PCR

- agaroz (SIGMA[®], ZDA) - polisaharid z visoko stopnjo čistosti, pridobivajo ga iz agarja. Dobro se topi v vroči vodi, po ohladitvi pa tvori porozni gel. Hranimo jo na suhem pri sobni temperaturi
- 1x TAE puferska raztopina; pripravimo jo z redčenjem 10x TAE puferske raztopine, ki je iz 0,4 M tris baze, 0,2 M očetne kisline in 0,01 M EDTA; vrednost pH je 8,3
- etidijev bromid, konc. 500 µg/ml (SIGMA[®], ZDA), dodajamo ga v raztopino agaroze, z nukleinsko kislino tvori kelate, vidne pod UV svetlobo
- 6x nanašalna raztopina (Fermentas, Hanover, Maryland, ZDA), ki jo dodajamo vzorcu pred nanosom na gel. Preprečuje izhajanje vzorca iz kanalčka, barvilo pa omogoča, da lahko opazujemo potovanje vzorca
- 50 bp velik označevalec molekulske mase DNA (GeneRuler[™] 50 bp DNA Ladder, MBI Fermentas, Hanover, Maryland, ZDA) v koncentraciji 0,1 µg DNA/µl
- 100 bp velik označevalec molekulske mase DNA (GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas, Hanover, Maryland, ZDA) v koncentraciji 0,1 mg DNA/ml

- "negativna" kontrola: ddH₂O
- "pozitivna" kontrola: hMPV, RV, Adv, ki so last laboratorija

3.1.7 Komerčni komplet Adenovirus Consensus[®] za določanje vrst adenovirusov (ARGENE, Francija)

Komplet je sestavljen iz amplifikacijskega in detekcijskega kita.

Vsebina amplifikacijskega kita:

- amplifikacijska reakcijska mešanica (R9), ki vsebuje začetne oligonukleotide, pufer, MgCl₂, dNTP,
- inhibitorna reakcijska mešanica (R10), ki vsebuje začetne oligonukleotide, pufer, MgCl₂, dNTP, inhibitorno kontrolo,
- pozitivna kontrola - Adv (R12).

Uporabili smo še:

- ddH₂O – demineralizirano in destilirano vodo brez ribonukleazne aktivnosti (negativna kontrola),
- Hot Start Taq[™] DNA polimerazo, konc. 5 U/μl (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija).

Vsebina detekcijskega kita:

- detekcijska negativna kontrola (R15)
- denaturacijska raztopina 1 (R16)
- denaturacijska raztopina 2 (R17)
- mikrotitrna ploščica (R18)
- raztopina "coating" (R19)
- Adv skupinska sonda (R20)
- kontrolna sonda (R21)
- 10x izpiralni pufer (R22), ki smo ga razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:10.
- konjugat (R23)

- konjugat streptavidin peroksidaze (R24) - koncentrat, ki smo ga razredčili s konjugatom (R23) v razmerju $R23 : R24 = 1:50$
- substrat – tetrametilbenzidin (R25)
- raztopina za vstavitev reakcije (R26)
- samolepilna folija (R27)
- specifična sonda za vrsto A (R28)
- specifična sonda za vrsto B1 (R29)
- specifična sonda za vrsto B2 (R30)
- specifična sonda za vrsto C (R31)
- specifična sonda za vrsto D (R32)
- specifična sonda za vrsto E (R33)
- specifična sonda za vrsto F (R34)

Vsi reagenti morajo biti shranjeni pri temperaturi od 2 do 8 °C .

3.1.8 Laboratorijska oprema in aparature

- hladilniki s temperaturami – 20 °C, + 4 °C (Gorenje)
- komora za osamitev virusne DNA (Herolab)
- komora za osamitev virusne RNA (TIP LFV 91T)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- avtomatske pipete z območji pipetiranja 1000 µl, 100 µl, 10 µl (Eppendorf)
- avtomatske pipete z območji pipetiranja 50-200 µl (Biohit – PROLINE)
- nastavki za avtomatske pipete (Eppendorf)
- vibracijski stresalnik (VIBROMIX 104 EV, Tehtnica)
- termoblok (Thermomixer Comfort, Eppendorf)
- zaščitne rokavice (Safeskin)
- epruvete velikosti 1,5 ml; 0,5 ml in 0,2 ml
- stojalo za epruvete
- spin centrifuga (Costar)
- komora za pripravo reakcijske mešanice za PCR (Herolab)
- komora za dodajanje DNA, RNA v reakcijsko mešanico (Herolab)

- aparatura za PCR (Eppendorf, Gmbh, Hamburg)
- kadička za elektroforezo (HORIZON™ BRL)
- mikrotiterska ploščica za mešanje vzorca in nanašalne raztopine za elektroforezo
- tehtnica (Sartorius)
- mikrovalovna pečica MWG 729 (CLATRONIC®) za pripravo gela
- erlenmajerice
- merilni valj
- staničevina
- napajalnik za elektroforezo (GIBCO BRL)
- nosilec za agarozni gel in glavnički
- kamera za snemanje agaroznih gelov (BIO-RAD Gel doc 2000)
- računalniški program (Quantity One, BIO-RAD)
- spektrofotometer (Human)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava kliničnega materiala

Kužnino v tekočem gojišču smo najprej premešali na vibracijskem stresalniku, nato pa centrifugirali pri 2000 vrt./min, da smo celice dobili v usedlini. Usedlino celic smo suspendirali v 250 µl PBS in tako pripravljene vzorce shranili pri – 70 °C.

3.2.2 Osamitev virusne DNA

Celokupno DNA smo osamili iz kužnine zgornjih dihal (brisov nosnega žrela) in različnih kužnin spodnjih dihal (aspiratov bronhija, bronhoalveolarnih izpirkov). Kužnine smo predhodno odtalili na sobni temperaturi. Za osamitev DNA smo uporabili komercialni komplet QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija).

PROTOKOL:

1. V označene 1,5 ml-eprovete smo odpipetirali 20 µl raztopine proteinaze K.
2. Proteinazi K smo dodali 200 µl vzorca. Če je bilo vzorca manj, smo ga dopolnili do 200 µl s pufrom PBS.

3. Vzorcju smo dodali še 200 µl puфра AL ter vse skupaj 10 sekund stresali na vibracijskem stresalniku.
4. Vzorec smo nato inkubirali 10 minut v termobloku pri temperaturi 56 °C.
5. Po dodatku 200 µl absolutnega etanola smo vzorec ponovno stresali na vibracijskem stresalniku.
6. Lizat smo prenesli v mini kolonico in centrifugirali 1 minuto pri 8000 vrt./min. Nato smo mini kolonico namestili v čisto zbiralno posodico, filtrat pa smo zavrgli.
7. Dodali smo 500 µl puфра AW1 ter centrifugirali 1 minuto pri 8000 vrt./min. Ponovno smo mini kolonico namestili v čisto zbiralno posodico, filtrat pa smo zavrgli.
8. Dodali smo 500 µl puфра AW2 ter centrifugirali 3 minute pri 14000 vrt./min. Nato smo mini kolonico namestili v čisto zbiralno posodico, filtrat pa smo zavrgli.
9. Vzorec smo ponovno centrifugirali 1 minuto pri 14000 vrt./min.
10. Mini kolonico smo prenesli v čisto 1,5 ml-epruveto in eluirali DNA s 100 µl puфра AE. Vzorec smo inkubirali 2 minuti na sobni temperaturi.
11. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 1 minuto pri 14000 vrt./min.
12. Mini kolonico smo zavrgli, osamljeno DNA pa smo shranili pri temperaturi –20 °C za preiskavo PCR.

3.2.3 Osamitev virusne RNA

Celokupno RNA smo osamili iz kužnine zgornjih dihal (brisoв nosnega žrela) in različnih kužnin spodnjih dihal (aspiratov bronhija, bronhoalveolarnih izpirkov). Kužnine smo predhodno odtalili na sobni temperaturi. Za osamitev virusne RNA smo uporabili komercialni komplet RNeasy[®] Protect Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Nemčija).

PROTOKOL:

1. Po odtajanju na sobni temperaturi smo vzorec premešali na vibracijskem stresalniku.
2. 400 µl vzorca smo odpipetirali v označeno 1,5 ml-epruveto.
3. Vzorcju smo dodali 350 µl ali 600 µl puфра RLT, odvisno od tega ali je bil vzorec bris nazofarinksa ali aspirat bronhija in BAL in nato pretresli na vibracijskem stresalniku. RLT pufer smo predhodno ustrezno pripravili; v 1 ml puфра RLT smo dodali 10 µl β-merkaptetoetnola.

3. Dodali smo 350 μ l ali 600 μ l 70-odstotnega etanola, glede na količino predhodno dodanega RLT pufra, in dobro premešali s pipeto.
4. 700 μ l vzorca smo prenesli v mini kolonico in centrifugirali 15 sekund pri 10000 vrt./min pri sobni temperaturi.
5. Mini kolonico smo nato namestili v čisto zbiralno posodico in dodali 700 μ l pufra RW1.
6. Ponovno smo centrifugirali 15 sekund pri 10000 vrt./min.
7. Nato smo mini kolonico namestili v čisto zbiralno posodico, dodali smo 500 μ l pufra RPE in nato centrifugirali 15 sekund pri 10000 vrt./min.
8. Po centrifugiranju smo dodali 500 μ l pufra RPE in nato centrifugirali 2 minuti pri 10000 vrt./min.
9. Mini kolonico smo prenesli v novo zbiralno posodico in centrifugirali 1 minuto pri 10000 vrt./min.
10. Mini kolonico smo prenesli v čisto 1,5 ml-epruveto in dodali 40 μ l vode brez ribonukleazne aktivnosti.
11. Nato smo centrifugirali 1 minuto pri 10000 vrt./min.
12. Mini kolonico smo zavrgli, osamljeno RNA pa smo shranili pri temperaturi -20 °C za preiskavo PCR.

3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo

- #### 3.2.4.1 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo (klasični PCR), verižne reakcije s polimerazo nested-PCR (n-PCR) in enostopenjske verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda za hitro pomnoževanje kateregakoli odseka DNA v velikem številu kopij *in vitro*. Reakcijsko mešanico za PCR sestavljajo osamljena DNA, temperaturno obstojna polimeraza DNA, deoksinukleotidtrifosfati (dNTP), par začetnih oligonukleotidov, soli in detergent v določenih koncentracijah. Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en cikel PCR. Te temperature predstavljajo posamezne faze: denaturacija DNA, spajanje začetnih oligonukleotidov z DNA ter sinteza komplementarne verige DNA. Pri 95 °C se dvojnovijačna molekula razdvoji v dve enojnovijačni molekuli DNA. Pri drugi

temperaturi, ki je navadno med 45 °C in 75 °C, se začetni oligonukleotidi pripenjajo na komplementarna dela enoverižne molekule DNA. Sinteza nove komplementarne molekule DNA v smeri od 5'-konca proti 3'-koncu s temperaturno obstojno polimerazo DNA poteka med tretjo inkubacijo pri 72 °C. Novi molekuli DNA sta med seboj komplementarni in sposobni v novem ciklu PCR vezati enake začetne oligonukleotide. Vsak naslednji temperaturni cikel podvoji količino tarčnega dela virusne DNA. Navadno PCR sestavlja od 25 do 40 zaporednih ponovitev temperaturnega cikla (Poljak, 2002).

Poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj dela virusnega genoma, ki ga želimo pomnožiti, je prvi pogoj za uspešno pomnoževanje. To nam omogoča pravilno izbiro začetnih oligonukleotidov, ki so komplementarni mejnima deloma odseka tarčnega genoma, ki ga želimo pomnožiti (Poljak, 2002). Poleg klasične metode pomnoževanja z zunanjimi začetnimi oligonukleotidi pri nekaterih virusih uporabljamo tudi reakcijo pomnoževanja z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Pri tej metodi pomnožujemo nastalo DNA pri klasičnem PCR. Pomnožujejo se krajši odseki virusne DNA. Metoda se imenuje nested PCR (n-PCR). Na ta način povečamo specifičnost pomnoževanja in zmanjšamo pojav lažno pozitivnih rezultatov prvega PCR, ki so posledica nastanka nespecifičnih pridelkov (Levstek, 1998).

Pri virusih z RNA moramo pred reakcijo PCR osamljeno RNA prepisati z encimom reverzno transkriptazo v komplementarno DNA (cDNA, angl.: complementary DNA). Temu sledi inaktivacija reverzne transkriptaze in razdvajanje RNA-cDNA dvojnovijačnice, nato pa se lahko začne klasično pomnoževanje DNA. Oba procesa, reverzno transkripcijo (RT) kot tudi pomnoževanje prepisane DNA (PCR), lahko izvedemo v enostopenjski reakciji RT-PCR. Vse namreč poteka v eni epruveti, s čimer se zmanjša možnost kontaminacije (Poljak, 2002).

3.2.4.2 Izvedba reakcije PCR za pomnoževanje odseka genoma adenovirusov, rinovirusov in metapneumovirusa

Za vsak virus smo izvedli ločen PCR, priprava vzorcev pa je potekala na enak način. Najprej smo v 0,5 ml ali 1,5 ml epruveti pripravili reakcijsko mešanico za določeno število vzorcev. Reagente smo predhodno premešali na vibracijskem stresalniku. Prav tako smo

premešali tudi reakcijsko mešanico in v označene 0,2 ml epruvete odpipetirali ustrezen volumen le-te. Reagenti in njihovi volumni v reakcijski mešanici so prikazani v preglednici 3.3. za Adv, v preglednici 3.5. za RV in v preglednici 3.7. za hMPV. V nadaljevanju smo dodali v reakcijsko mešanico še ustrezno količino DNA ali RNA (Preglednice 3.3., 3.5., 3.7.), pozitivno in negativno kontrolo. Končni volumen reakcijske mešanice je bil v vseh primerih 50 μ l. Tako pripravljene vzorce smo vstavili v aparaturo za PCR in vključili ustrezen program. Programe PCR za različne viruse prikazujejo preglednice 3.4., 3.6. in 3.8.

Kot pozitivno kontrolo smo uporabljali ustrezno količino DNA ali RNA virusa, ki je last laboratorija, negativno kontrolo pa je predstavljala ddH₂O.

Pri pomnoževanju DNA ali RNA posameznih virusov smo uporabili par skupinsko specifičnih zunanjih začetnih oligonukleotidov, značilnih za določen virus. Pomnoževali smo različno dolge odseke virusnega genoma posameznih virusov (Preglednica 3.2). Pri Adv smo izvedli tudi n-PCR. Uporabili smo notranje začetne oligonukleotide za pomnoževanje krajšega odseka DNA (Preglednica 3.2). Priprava reakcijske mešanice je potekala tako, kot je že navedeno, le da smo kot vzorec uporabili pridelek, ki je nastal pri klasičnem PCR.

Preglednica 3.3: Sestava reakcijske mešanice za klasični PCR in nested-PCR za adenoviruse

Reagenti	Koncentracija reagenta	Končna koncentracija reagenta v 50 μ l		Količina dodanega reagenta (μ l)	
		PCR	n-PCR	PCR	n-PCR
Reakcijski pufer	10x	1x	1x	5	5
Mešanica dNTP	10 mM	0,1 mM	0,15 mM	0,5	0,75
Začetni oligonukleotid 1	20 μ M	0,2 μ M	0,3 μ M	0,5	0,75
Začetni oligonukleotid 2	20 μ M	0,2 μ M	0,3 μ M	0,5	0,75
Polimeraza Taq	5 U/ μ l	0,05 U/ μ l	0,075 U/ μ l	0,5	0,75
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5 mM	3	3
ddH ₂ O				30	31,5
DNA				10	7,5
Skupni volumen				50	50

Legenda:

dNTP- deoksinukleotid trifosfat

n-PCR- nested-PCR

U- enota za encimsko aktivnost (angl.: unit)

Taq- *Thermus aquaticus*

Preglednica 3.4: Program klasičnega PCR in nested-PCR za pomnoževanje odseka adenovirusov

Proces	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Začetno razdvajanje	94	4 min	1
Razdvajanje	94	30 s	5
Spajanje začetnih nukleotidov z DNA	56	50 s	
podaljševanje	72	50 s	
Razdvajanje	94	30 s	15
Spajanje začetnih nukleotidov z DNA	46	50 s	
podaljševanje	72	50 s	
Razdvajanje	94	30 s	20
Spajanje začetnih nukleotidov z DNA	54	50 s	
podaljševanje	72	50 s	

Preglednica 3.5: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo RT-PCR za rinoviruse

Reagenti	Koncentracija reagenta	Končna koncentracija reagenta v 50 µl	Količina dodanega reagenta (µl)
5x reakcijski pufer		1x	10
Mešanica dNTP	10 mM	0,2 mM	1
Začetni oligonukleotid 1	20 µM	0,4 µM	1
Začetni oligonukleotid 2	20 µM	0,4 µM	1
Mešanica encimov			2
5x pufer Q		1 x	10
ddH ₂ O			15
RNA			10
Skupni volumen			50

Legenda:

dNTP- deoksinukleotid trifosfat

RT-PCR- enostopenjska verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription-polymerase chain reaction)

Preglednica 3.6: Program RT-PCR za pomnoževanje odseka rinovirusov

Proces	Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
Reverzna transkripcija	42	45	1
Inaktivacija RT in razdvajanje	94	2	1
Razdvajanje	94	1	35
Spajanje začetnih oligonukleotidov z DNA	54	1	
Podaljševanje	72	1	
Končno podaljševanje	72	7	1

Legenda:

RT-PCR- enostopenjska verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription-polymerase chain reaction)

RT- reverzna transkripcija

Preglednica 3.7 Sestava reakcijske mešanice za RT-PCR za metapneumovirus

Reagenti	Koncentracija reagenta	Končna koncentracija reagenta v 50 µl	Količina dodanega reagenta (µl)
5x AMV/Tfl pufer		1x	10
Mešanica dNTP	10 mM	0,2 mM	1
Začetni oligonukleotid 1	20 µM	0,3 µM	0,75
Začetni oligonukleotid 2	20 µM	0,3 µM	0,75
MgSO ₄	25 mM	1 mM	2
AMV reverzna transkriptaza	5 U/µl	0,1 U/µl	1
ddH ₂ O			32,5
Tfl DNA polimeraza	5 U/µl	0,1 U/µl	1
RNA			1
Skupni volumen			50

Legenda:

RT-PCR- enostopenjska verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription-polymerase chain reaction)

dNTP- deoksinukleotid trifosfat

AMV- virus ptičje mieloblastoze (angl.: avian myeloblastosis virus)

Tfl- *Thermus flavus*

U- enota za encimsko aktivnost (angl.: unit)

Preglednica 3.8: Program RT-PCR za pomnoževanje odseka metapneumovirusa

Proces	Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
Reverzna transkripcija	42	45	1
Inaktivacija RT in razdvajanje	95	5	1
Razdvajanje	95	1	45
Spajanje začetnih oligonukleotidov z DNA	54,1	1	
Podaljševanje	72	2	
Končno podaljševanje	72	10	1

Legenda:

RT-PCR- enostopenjska verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription-polymerase chain reaction)

RT- reverzna transkripcija

3.2.5 Pogoji za uspešno izvedbo reakcije PCR

Da preprečimo pojav lažno pozitivnih rezultatov, ki so posledica kontaminacije, mora vsaka stopnja celotnega postopka, od osamitve virusne nukleinske kisline do reakcije PCR in dokazovanja pridelkov PCR potekati fizično ločeno. Tega smo se tudi držali, saj smo vsako stopnjo postopka izvajali v ločenih in zato namenjenih prostorih. Vsak prostor je imel svojo lastno laboratorijsko opremo, predvsem pipete in nastavke za enkratno uporabo. Uporabljali smo rokavice in jih tudi pogosto menjavali. Po končanem delu smo delovne površine in laboratorijski pribor temeljito očistili. Vse skupaj smo izpostavili delovanju UV svetlobe vsaj za 60 minut.

3.2.6 Priprava vzorcev za elektroforezo, elektroforeza in detekcija pridelkov v agaroznem gelu

3.2.6.1 Osnove elektroforeze

Po končani reakciji PCR je rezultat pomnoževanja pozitiven ali negativen glede na to, ali smo dokazali pridelek PCR in potrdili njegove značilnosti. Največkrat se za to uporablja horizontalno elektroforezo v agaroznem gelu, ki omogoča ločevanje delcev DNA po velikosti. Gre za metodo, pri kateri molekule v raztopini potujejo v električnem polju. V električnem polju se negativno nabita molekula DNA giblje proti pozitivno nabiti elektrodi. Za določevanje velikosti neznanega delca DNA uporabimo označevalec

molekulske mase. Primerjamo velikost delca DNA in standarda, ki ju ločujemo pod istimi pogoji elektroforeze (Levstek, 1998; Poljak, 2002). Gel po končani elektroforezi osvetljujemo z UV svetlobo. Ker gelu pri pripravi dodamo etidijev bromid, ki interkalira z DNA, nastali kompleksi fluorescirajo v UV svetlobi (Levstek, 1998).

3.2.6.2 Izvedba elektroforeze

Pridelke PCR smo identificirali z elektroforezo v 2 % (u/v) agaroznem gelu. Za pripravo 50 ml 2 % agaroznega gela smo v erlenmajerico zatehtali 1 g agaroze ter dodali 50 ml 1x TAE pufra. Vse skupaj smo segrevali v mikrovalovni pečici. Ko je bila agarozna popolnoma stopljena, smo erlenmajerico ohladili pod vodo, dodali 20 µl etidijevega bromida, premešali in gel vlili v nosilec za gel. Predhodno smo v nosilec že namestili glavniček za žepke. Če so se v gelu pojavili mehurčki zraka, smo jih morali odstraniti, da ne bi motili potovanja vzorcev. Ko se je gel strdil, smo ga namestili v kadičko in ga prelili z 1x TAE pufrom. Nato smo odstranili glavničke.

V mikrotiterski ploščici smo zmešali 20 µl vzorca s 4 µl nanašalne raztopine. V žepke smo nanesli 20 µl nastale mešanice in 5,5 µl že pripravljenega molekulskega označevalca DNA. Elektroforezno kadičko smo priključili na napajalnik z napetostjo 98 V. Elektroforeza je tekla približno 60 minut. Po končani elektroforezi smo gel pregledali s kamero Gel Doc 2000. Z računalniškim programom Quantity one pa smo sliko gela ustrezno obdelali in shranili. Ustrezen pridelek PCR smo določali tako, da smo primerjali velikost vzorca DNA z velikostjo molekulskega označevalca in pozitivne kontrole.

3.2.7 Poskus določanja vrst adenovirusov

Vzorcem, ki so bili pozitivni po reakciji n-PCR za Adv, smo želeli določiti vrsto s komercialnim kompletom Adenovirus Consensus[®] (ARGENE, Francija). Test omogoča detekcijo Adv genomov v eni sami reakciji PCR. Nato sledi analiza pridelkov PCR s hibridizacijo v mikrotiterski ploščici z uporabo biotinilirane sode in detekcija z ELISO.

3.2.7.1 PCR Adenovirus Consensus[®]

Kadar želimo v eni sami reakciji zajeti več vrst virusov, uporabimo za pomnoževanje skupinsko značilne začetne oligonukleotide, skladne s področji genoma, ki so enaki pri večini tipov določenega virusa (Poljak, 2002).

Z reakcijo PCR Adenovirus Consensus[®] smo pomnoževali odsek gena VA RNA velik od 300 do 600 bp, odvisno od posamezne vrste virusa. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili plazmid, ki je vseboval Adv zaporedja, komplementarna začetnim oligonukleotidom. Dobili smo ga v kompletu. V reakcijo smo vključili tudi inhibitorno reakcijsko mešanico, s katero smo ugotavljali inhibitorje v vzorcu, ki bi lahko motili pomnoževanje DNA. Kot negativno kontolo smo uporabili ddH₂O.

PROTOKOL:

Najprej smo si pripravili shemo za PCR, saj smo vsak vzorec pomnoževali v amplifikacijski in inhibitorni reakcijski mešanici, pozitivno in negativno kontrolo pa samo v aplifikacijski mešanici. Shemo prikazuje preglednica 3.9.

Preglednica 3.9: Shema za reakcijo PCR Adenovirus Consensus[®]

Št. vzorca	Vrsta reakcijske mešanice	Vrsta vzorca	Rezultat
1	amplifikacijska	vzorec A	
2	inhibitorna	vzorec A	
3	amplifikacijska	vzorec B	
4	inhibitorna	vzorec B	
5	amplifikacijska	pozitivna kontrola	
6	amplifikacijska	negativna kontrola	

Ustrezno smo razredčili Hot Start Taq[™] DNA polimerazo in pripravili obe reakcijski mešanici. Pri tem smo uporabili naslednje enačbe:

$$a = \text{št. vorcev} + \text{poz. kntrola} + \text{neg. kntrola}$$

$$b = \text{št. vzorcev} \dots(1)$$

Hot Start TaqTM DNA polimeraza

$$(a + b + 2) \times 5 \mu\text{l } H_2O + (a + b + 2) \times 0,3 \mu\text{l } \textit{Hot Start Taq} \quad \dots (2)$$

amplifikacijska reakcijska mešanica (R9)

$$(a + 1) \times 40 \mu\text{l } R9 + (a + 1) \times 5 \mu\text{l } \textit{razredčene Hot Start Taq} \quad \dots (3)$$

inhibitorna reakcijska mešanica (R10)

$$(b + 1) \times 40 \mu\text{l } R10 + (b + 1) \times 5 \mu\text{l } \textit{razredčene Hot Start Taq} \quad \dots (4)$$

V vse 0,2 ml epruvete, v katerih je potekala reakcija PCR, smo odpipetirali 40 μl pripravljene amplifikacijske oz. inhibitorne reakcijske mešanice. Nato smo dodali po 5 μl ustrezne DNA, pozitivne in negativne kontrole.

Tako pripravljene vzorce smo vstavili v aparaturo za PCR in vključili ustrezen program, ki ga prikazuje preglednica 3.10.

Preglednica 3.10: Program PCR Adenovirus Consensus[®]

Proces	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Začetno razdvajanje, aktivacija encima	95	15 min	1
Razdvajanje	94	10 s	10
Spajanje začetnih nukleotidov z DNA*	65	30 s	
podaljševanje	72	30 s	
Razdvajanje	94	10 s	30
Spajanje začetnih nukleotidov z DNA	55	30 s	
podaljševanje	72	30 s	
Končno podaljševanje	72	2 min	1

* temperatura spajanja začetnih oligonukleotidov se z vsakim ciklom zmanjša za 1°C

Reakcija PCR Adenovirus consensus[®] poteka z vročim začetkom. Na ta način se izognemo nespecifičnemu spajanju začetnih oligonukleotidov pred prvim pomnoževanjem s polimerazo. Reakcijska mešanica je najprej izpostavljena začetnemu razdvajanju pri 95 °C za 15 minut, tako da razpadejo vse naključno nastale dvoverižne vijačnice, hkrati pa ta stopnja omogoča aktivacijo polimeraze, ki je Hot Start TaqTM DNA polimeraza.

3.2.7.2 Detekcija pridelkov PCR

3.2.7.2.1 Hibridizacija

Hibridizacijske metode temeljijo na razdvajanju komplementarnih vijačnic DNA (denaturacija) ter ponovni povezavi komplementarnih vijačnic v dvojnovijačno DNA (renaturacija ali hibridizacija). Če po denaturaciji dodamo vzorcu manjši, označeni komplementarni del nukleinske kisline – sondo, se bo ta v procesu renaturacije vezala s komplementarnimi deli tarčne DNA ali RNA. Sonde so označene z različnimi označevalci, od katerih je odvisen način predstavitve rezultatov (Poljak, 2002).

PROTOKOL:

Test smo izvajali v mikrotitrski ploščici z 12 preničnimi stolpci, v vsakem pa je 8 vdolbinic. Pripravili smo si shemo za razporeditev pridelkov PCR in sond. Potrebovali smo:

- eno vdolbinico za vzorec z amplifikacijsko reakcijsko mešanico in sondo R20,
- eno vdolbinico za vzorec z inhibitorno reakcijsko mešanico in sondo R20,
- eno vdolbinico za pozitivno kontrolo R12 in sondo R21,
- eno vdolbinico z amplificirano vodo in sondo R21,
- eno vdolbinico z amplificirano vodo in sondo R21,
- eno vdolbinico za detekcijsko negativno kontrolo in sondo R20,
- eno vdolbinico za detekcijsko negativno kontrolo in sondo R21.

Nato smo izvedli hibridizacijo z ELISO v naslednjih korakih:

1. Denaturacija

V označeno 1,5 ml-epruveto smo odpipetirali 5 µl pridelka PCR ali kontrole. Dodali smo 10 µl R16 in premešali s pipeto. Nato smo dodali še 10 µl R17 in ponovno premešali s pipeto. Vse skupaj smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi.

2. Fiksacija

Dobljeni mešanici smo dodali 800 µl R19 in premešali na vibracijskem stresalniku. Odpipetirali smo 100 µl in prenesli v vdolbinice na mikrotitrski ploščici (R18). Mikrotitrsko ploščico smo nato inkubirali 60 minut pri temperaturi 37 °C.

3. Hibridizacija

Segreli smo sonde R20 in R21 s 15 minutno inkubacijo pri temperaturi 37 °C. Nato smo izpraznili vdolbinice in v vsako odpipetirali 100 µl ustrezne sonde. Vdolbinice smo prekrili s samolepilno folijo (R27) in inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 °C.

4. Spiranje

Izpraznili smo vdolbinice in v vsako odpipetirali z multikanalsko pipeto 350 µl R22, ki smo ga predhodno ustrezno pripravili (zmešali smo 1 volumen 10x R22 z 9 volumni ddH₂O). Inkubirali smo 30 sekund na sobni temperaturi, nato smo vdolbinice izpraznili. Postopek smo ponovili štirikrat.

5. Detekcija

Izpraznili smo vdolbinice in vanje odpipetirali 100 µl R24, razredčenega z R23, ki smo ga predhodno ustrezno pripravili (zmešali smo 1 volumen 50x R24 z 49 volumni R23). Nato smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.

6. Spiranje

Ponovili smo postopek pod točko štiri.

7. Detekcija

Izpraznili smo vdolbinice in v vsako odpipetirali 100 µl R25. Vdolbinice smo prekrili s samolepilno folijo in nato inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi v temi.

8. Ustavitev reakcije

Dodali smo 100 µl R26.

9. Branje rezultatov

S spektrofotometrom smo izmerili optično gostoto (OD) pri 450 nm.

3.2.7.2.2 Validacija testa in določitev mejne (cut-off) vrednosti

Ko smo izmerili OD pri 450 nm, smo najprej preverili ali je test potekal pravilno. OD detekcijske negativne kontrole z obema sondama je morala biti manj kot 0,4. Povprečno mejno vrednost iz detekcijske negativne kontrole z obema sondama smo izračunali z naslednjo enačbo:

$$\text{Mejna vrednost} = OD + 0,15 \quad \dots (5)$$

OD vode je morala biti pod mejno vrednostjo, OD pozitivne kontrole pa je morala biti večja od le-te.

3.2.7.2.3 Interpretacija rezultatov

Za določitev pozitivnih in negativnih rezultatov smo upoštevali naslednja dejstva:

- Če je bila OD vzorca večja od "cut-off" + 10 %, je bila reakcija PCR pozitivna.
- Če je bila OD vzorca manjša od "cut-off" - 10 %, je bila reakcija PCR negativna.
- Če je bila OD vzorca enaka "cut-off" +/- 10 %, je bilo potrebno reakcijo PCR ponoviti.

V končno interpretacijo pa smo vključili tudi inhibitorne kontrole:

- Če je bila OD inhibitorne kontrole večja od 0,8 in je bil vzorec s skupinsko sondo negativen, je pomnoževanje lahko poteklo, zato smo vzorec opredelili kot negativen.
- Če je bila OD inhibitorne kontrole manjša od 0,8 in je bil vzorec s skupinsko sondo negativen, smo morali ponovno izolirati že osamljeno DNA, saj je vzorec najbrž vseboval inhibitorje pomnoževanja.
- Če je bila OD inhibitorne kontrole negativna in je bil vzorec s skupinsko sondo pozitiven, smo vzorec opredelili kot pozitiven. Močno pozitivni vzorci namreč lahko ovirajo pomnoževanje kontrole inhibicije, posledica česar je šibek oz. negativen rezultat za kontrolo inhibicije.

3.2.7.3 Detekcija pridelkov PCR za določitev vrst adenovirusov

Če je bil vzorec pozitiven s skupinsko sondo, smo naredili še en test za določitev posameznih vrst.

PROTOKOL:

Kot pri prvem testu smo si tudi sedaj pripravili shemo za razporeditev pridelkov PCR in sond v mikrotitrski ploščici;

- 7 vdolbinic za pozitiven vzorec in sonde R28, R29, R30, R31, R32, R33 in R34,
- eno vdolbinico za pozitivno kontrolo R12 in sondo R21,

- 8 vdolbinic za detekcijsko negativno kontrolo in sonde R28, R29, R30, R31, R32, R33 in R34.

Test smo izvedli v naslednjih korakih:

1. Denaturacija

V označeno 1,5 ml-epruveto smo odpipetirali 200 μ l pridelka PCR ali kontrole. Dodali smo 40 μ l R16 in premešali na vibracijskem stresalniku. Nato smo dodali 40 μ l R17 in ponovno premešali na vibracijskem stresalniku. Vse skupaj smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi.

2. Fiksacija

Dobljeni mešanici smo dodali 800 μ l R19 in premešali na vibracijskem stresalniku. Odpipetirali smo 100 μ l in prenesli v vdolbinice na mikrotitrski ploščici (R18). Mikrotitrsko ploščico smo nato inkubirali 60 minut pri temperaturi 37 °C.

3. Hibridizacija

Segreli smo sonde R21 in R28, R29, R30, R31, R32, R33 ter R34 s 15 minutno inkubacijo pri temperaturi 37 °C. Izpraznili smo vdolbinice in nato v vsako odpipetirali 100 μ l ustrezne sonde. Vdolbinice smo prekrili s samolepilno folijo (R27) in inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 °C.

4. Spiranje

Izpraznili smo vdolbinice in v vsako odpipetirali z multikanalno pipeto 350 μ l R22, ki smo ga predhodno ustrezno pripravili (zmešali smo 1 volumen 10x R22 z 9 volumni dH₂O). Inkubirali smo 30 sekund pri sobni temperaturi. Postopek smo ponovili štirikrat.

5. Detekcija

Izpraznili smo vdolbinice in vanje odpipetirali 100 μ l R24 razredčenega z R23, ki smo ga predhodno ustrezno pripravili (zmešali smo 1 volumen 50x R24 z 49 volumni R23). Nato smo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi.

6. Spiranje

Ponovili smo postopek pod točko štiri.

7. Detekcija

Izpraznili smo vdolbinice in v vsako odpipetirali 100 μ l R25. Vdolbinice smo prekrili s samolepilno folijo in nato inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi v temi.

8. Ustavitev reakcije

Dodali smo 100 μ l R26.

9. Branje rezultatov

S spektrofotometrom smo izmerili optično gostoto pri 450 nm.

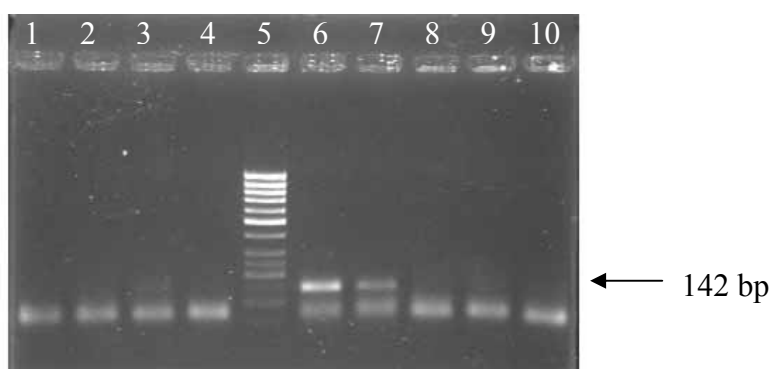
Po končanem testu smo določili mejno vrednost, pozitivne in negativne rezultate na enak način kot pri prvem testu.

4 REZULTATI

4.1 POMNOŽEVANJE TARČNEGA ODSEKA GENOMA ADENOVIRUSOV V REAKCIJI nested-PCR TER ODSEKA GENOMA RINOVIRUSOV IN METAPNEUMOVIRUSA V REAKCIJI RT-PCR

Virusno nukleinsko kislino smo osamili s komercialnimi kompleti ter nato pomnoževali posamezne odseke genomov z metodo n-PCR in metodo RT-PCR. Uspešnost pomnoževanja smo dokazovali z elektroforezo. Slike 4.2 – 4.3 prikazujejo fotografije elektroforeznih gelov, ki služijo za interpretiranje in arhiviranje rezultatov.

4.1.1 Adenovirusi

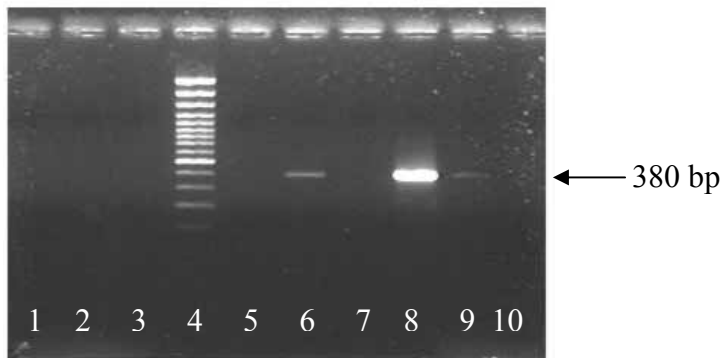


Slika 4.1: Elektroforezni prikaz rezultatov pomnoževanja 142 bp dolgega odseka gena za hekson adenovirusa z metodo nested-PCR

Legenda:

- 1- vzorec 39 (negativen)
- 2- vzorec 50 (negativen)
- 3- vzorec 27 (negativen)
- 4- vzorec 30 (negativen)
- 5- označevalec molekulske mase (50 bp)
- 6- pozitivna kontrola (142 bp)
- 7- vzorec 59 (pozitiven)
- 8- negativna kontrola (ddH₂O)
- 9- vzorec 25 (negativen)
- 10- vzorec 56 (negativen)

4.1.2 Rinovirusi



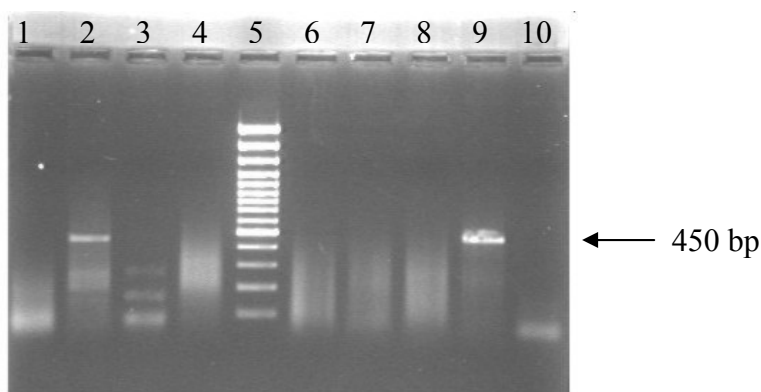
Slika 4.2: Elektroforezni prikaz rezultatov pomnoževanja 380 bp dolgega odseka 5' nekodirajoče regije (5'-NCR) rinovirusa z metodo RT-PCR

Legenda:

- 1- vzorec 10 (negativen)
- 2- vzorec 42 (negativen)
- 3- vzorec 22 (negativen)
- 4- označevalec molekulske mase (100 bp)
- 5- negativna kontrola (ddH₂O)
- 6- vzorec 4 (pozitiven)
- 7- vzorec 57 (negativen)
- 8- pozitivna kontrola (380 bp)
- 9- vzorec 46 (pozitiven)
- 10- vzorec 63 (negativen)

RT-PCR- verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse-transcription polymerase chain reaction)

4.1.3 Človeški metapneumovirus



Slika 4.3.: Elektroforezni prikaz rezultatov pomnoževanja 450 bp dolgega odseka gena za fuzijski protein (F) človeškega metapneumovirusa z metodo RT-PCR

Legenda:

- 1- vzorec 5 (negativen)
- 2- vzorec 1 (pozitiven)
- 3- vzorec 6 (negativen)
- 4- vzorec 40 (negativen)
- 5- označevalec molekulske mase (100 bp)
- 6- vzorec 18 (negativen)
- 7- vzorec 22 (negativen)
- 8- vzorec 60 (negativen)
- 9- pozitivna kontrola (450 bp)
- 10- negativna kontrola (ddH₂O)
- RT-PCR- verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription-polymerase chain reaction)

4.2 DOKAZOVANJE ADENOVIRUSOV, RINOVIRUSOV IN ČLOVEŠKEGA METAPNEUMOVIRUSA V KLINIČNEM MATERIALU

4.2.1 Bolniki in značilnosti kužnin

DNA Adv ter RNA RV in hMPV smo določali v 63 kužninah iz zgornjih in spodnjih dihal 34 otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Pregledali smo 30 brisov nosnega žrela, 29 bronhoalveolarnih izpirkov in 4 aspirate bronhija. Kužnine so bile odvzete v različnih mesecih v obdobju od leta 2003 do vključno leta 2005. V raziskavo je bilo vključenih 20/34 (58,8 %) otrok moškega spola in 14/34 (41,2 %) otrok ženskega spola. Otroci so bili stari od 4 mesecev do 16 let (Preglednici 4.1. in 4.2.).

Preglednica 4.1.: Kužnine iz zgornjih dihal ter rezultati reakcije nested-PCR in reakcije RT-PCR

Št. vzorca	Št. pacienta	Datum odvzema	Starost	Spol	Vrsta kužnine	n-PCR		
						Adv	RV	hMPV
1	1	18. 03. 2003	8 mes.	Ž	bris NŽ	-	-	+
2	2	25. 03. 2003	8 mes.	Ž	bris NŽ	-	-	+
3	4	29. 04. 2003	8 mes.	M	bris NŽ	-	-	-
4	5	13. 05. 2003	4 mes.	Ž	bris NŽ	-	+	-
5	6	13. 05. 2003	2 l.	Ž	bris NŽ	+	-	-
6	7	27. 05. 2003	1 l.	M	bris NŽ	+	-	-
7	8	27. 05. 2003	1 l.	M	bris NŽ	-	-	+
8	9	04. 06. 2003	3 l.	M	bris NŽ	-	-	-
9	10	11. 07. 2003	1 l.	Ž	bris NŽ	-	-	-

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 4.1.: Kužnine iz zgornjih dihal ter rezultati reakcije nested-PCR ter reakcije RT-PCR

Št. vzorca	Št. pacienta	Datum odvzema	Starost	Spol	Vrsta kužnine	n-PCR	RT-PCR	
						Adv	RV	hMPV
10	11	22. 07. 2003	3 l.	Ž	bris NŽ	+	-	-
11	12	17. 09. 2003	1 l.	M	bris NŽ	-	-	-
12	13	21. 10. 2003	8 mes.	M	bris NŽ	-	-	-
13	14	28. 10. 2003	16 l.	M	bris NŽ	-	-	-
14	15	28. 10. 2003	3 l.	Ž	bris NŽ	-	-	-
15	16	05. 11. 2003	2 l.	M	bris NŽ	-	-	-
16	17	25. 11. 2003	2 l.	M	bris NŽ	-	-	-
17	18	23. 12. 2003	3 l.	M	bris NŽ	-	-	-
18	19	26. 04. 2004	2 l.	Ž	bris NŽ	-	-	-
19	20	28. 04. 2004	2 l.	Ž	bris NŽ	+	-	-
20	21	03. 06. 2004	1 l.	Ž	bris NŽ	-	-	-
21	22	08. 06. 2004	2 l.	M	bris NŽ	-	-	-
22	23	21. 06. 2004	3 l.	Ž	bris NŽ	-	-	-
23	24	21. 06. 2004	3 l.	Ž	bris NŽ	+	-	-
24	25	31. 08. 2004	8 l.	M	bris NŽ	+	-	-
25	26	07. 09. 2004	4 mes.	M	bris NŽ	-	-	-
26	27	04. 01. 2005	2 l.	M	bris NŽ	-	-	-
27	28	18. 01. 2005	3 l.	M	bris NŽ	-	-	-
28	29	01. 02. 2005	1 l.	M	bris NŽ	-	-	-
29	32	01. 08. 2005	3 l.	M	bris NŽ	-	-	+
30	33	09. 11. 2005	3 l.	Ž	bris NŽ	-	-	-

Legenda:

M- moški spol

Ž- ženski spol

l- leto

mes- mesec

- negativen rezultat

+ pozitiven rezultat

NŽ- nosno žrelo

n-PCR- dvostopenjska verižna reakcija s polimerazo (angl.: nested polymerase chain reaction)

RT-PCR- verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription polymerase chain reaction)

Adv- adenovirus

RV- rinovirus

hMPV- človeški metapneumovirus

Preglednica 4.2.: Kužnine iz spodnjih dihal in rezultati reakcije nested-PCR ter reakcije RT-PCR

Št. vzorca	Št. pacienta	Datum odvzema	Starost	Spol	Vrsta kužnine	n-PCR		RT-PCR	
						Adv	RV	hMPV	
31	1	18. 03. 2003	8 mes.	Ž	BAL	-	-	-	
32	2	25. 03. 2003	8 mes.	Ž	BAL	-	-	-	
33	3	11. 04. 2003	2 l.	M	BAL	-	-	+	
34	4	29. 04. 2003	8 mes.	M	aspirat bronhija	-	-	-	
35	5	13. 05. 2003	4 mes.	Ž	BAL	-	-	-	
36	6	13. 05. 2003	2 l.	Ž	BAL	-	-	-	
37	7	27. 05. 2003	1 l.	M	BAL	+	-	-	
38	8	27. 05. 2003	1 l.	M	BAL	-	-	-	
39	9	04. 06. 2003	3 l.	M	aspirat bronhija	-	-	-	
40	10	11. 07. 2003	1 l.	Ž	aspirat bronhija	-	-	-	
41	11	22. 07. 2003	3 l.	Ž	BAL	-	-	-	
42	12	17. 09. 2003	1 l.	M	BAL	-	-	-	
43	13	21. 10. 2003	8 mes.	M	aspirat bronhija	-	-	-	
44	14	28. 10. 2003	16 l.	M	BAL	-	-	-	
45	15	28. 10. 2003	3 l.	Ž	BAL	-	-	-	
46	16	05. 11. 2003	3 l.	M	BAL	+	+	-	
47	17	25. 11. 2003	2 l.	M	BAL	+	-	-	
48	18	23. 12. 2003	3 l.	M	BAL	-	-	-	
49	19	26. 04. 2004	2 l.	Ž	BAL	-	-	-	
50	20	28. 04. 2004	2 l.	Ž	BAL	-	-	-	
51	22	08. 06. 2004	2 l.	M	BAL	-	-	-	
52	23	21. 06. 2004	3 l.	Ž	BAL	-	-	-	
53	24	21. 06. 2004	3 l.	Ž	BAL	-	-	-	
54	25	31. 08. 2004	8 l.	M	BAL	-	-	-	
55	26	07. 09. 2004	4 mes.	M	BAL	-	-	-	
56	27	04. 01. 2005	2 l.	M	BAL	-	-	-	
57	28	18. 01. 2005	3 l.	M	BAL	-	-	-	
58	29	01. 02. 2005	1 l.	M	BAL	-	-	-	
59	30	01. 04. 2005	2 l.	Ž	BAL	+	-	-	
60	31	24. 05. 2005	9 l.	M	BAL	-	-	-	
61	32	01. 08. 2005	3 l.	M	BAL	-	-	-	

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 4.2.: Kužnine iz spodnjih dihal in rezultati reakcije nested-PCR ter reakcije RT-PCR

Št. vzorca	Št. pacienta	Datum odvzema	Starost	Spol	Vrsta kužnine	n-PCR		
						Adv	RV	hMPV
62	33	09. 11. 2005	3 l.	Ž	BAL	-	+	-
63	34	14. 12. 2005	15 l.	M	BAL	-	-	-

Legenda:

M- moški spol

Ž- ženski spol

l- leto

mes- mesec

- negativen rezultat

+ pozitiven rezultat

BAL- bronhoalveolarni izpirek (angl.: bronchoalveolar lavage)

n-PCR- dvostopenjska verižna reakcija s polimerazo (angl.: nested polymerase chain reaction)

RT-PCR- verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl.: reverse transcription polymerase chain reaction)

Adv- adenovirus

RV- rinovirus

HMPV- človeški metapneumovirus

V vseh 63 kužninah, od tega 30 iz zgornjih dihal in 33 iz spodnjih dihal, smo dokazovali Adv z metodo n-PCR, RV in hMPV pa z metodo RT-PCR. Od 63 pregledanih kužnin smo Adv dokazali skupno v 10/63 (15,8 %) kužninah, RV v 3/63 (4,7 %) kužninah in hMPV v 5/63 (7,9 %) kužninah. Rezultate prikazuje preglednica 4.3.

Preglednica 4.3: Številčni prikaz navzočnosti adenovirusov, rinovirusov in človeškega metapneumovirusa v zgornjih in spodnjih dihalih

	adenovirusi			rinovirusi			človeški metapneumovirus		
	skupaj	pozitivni	negativni	skupaj	pozitivni	negativni	skupaj	pozitivni	negativni
Število vzorcev	63	10	53	63	3	60	63	5	58
%		15,8	84,2		4,7	95,3		7,9	92,1

Od 10 kužnin, ki smo jim določili Adv, je bilo 6/10 kužnin iz zgornjih dihal, 4/10 kužnin pa iz spodnjih dihal. Ena od 3 kužnin, ki je imela RV, je bila iz zgornjih dihal, drugi 2/3 kužnin pa sta bili iz spodnjih dihal. Od 5 kužnin, ki smo jim določili hMPV, so bile 4/5 kužnin iz zgornjih dihal, 1/5 kužnin pa je bila iz spodnjih dihal. Pri otrocih, ki smo jim dokazali Adv v dihalih, je bilo 5/9 otrok ženskega spola, 4/9 otroci pa moškega spola. Pri

enem otroku smo Adv dokazali v kužnini iz zgornjih dihal in tudi v kužnini iz spodnjih dihal. Deček je bil star eno leto. Od 3 otrok, ki so imeli RV, sta bila dva ženskega spola. hMPV pa smo dokazali pri 3/5 otrok moškega spola. Samo pri enem otroku smo ugotovili sočasno dva virusa, in sicer Adv in RV. Deček je bil star 2 leti. Oba virusa smo dokazali v spodnjih dihalih. Otroci, pozitivni za hMPV, so bili stari od 8 mesecev do 3 let. RV smo dokazali pri otrocih, starih od 4 mesece do 3 let. Adv smo dokazali v kužninah otrok, starih od 1 do 8 let.

4.3 DOLOČANJE POSAMEZNIH VRST ADENOVIRUSOV Z METODO PCR ADENOVIRUS CONSENSUS®

Vzorcem s pozitivnim rezultatom po reakciji n-PCR smo določili še vrsto z metodo PCR Adenovirus Consensus®. Ta test omogoča določitev posamezne vrste Adv v kužninah iz zgornjih in spodnjih dihal. Metodi n-PCR in PCR Adenovirus Consensus® nista dali enakih rezultatov. Le-te prikazuje preglednica 4.3..

Preglednica 4.4. Rezultati reakcije nested-PCR in reakcije PCR Adenovirus consensus®

Št. vzorca	Št. pacienta	Vrsta kužnine	Rezultat n-PCR	Jakost sevanja odsekov DNA na elektroforeznem gelu	Rezultat PCR Adenovirus Consensus®	
					PCR	vrsta
19	20	bris NŽ	+	močen	+	B1
10	11	bris NŽ	+	šibek	-	-
6	7	bris NŽ	+	šibek	-	-
23	24	bris NŽ	+	močen	+	B1
24	25	bris NŽ	+	šibek	-	-
5	6	bris NŽ	+	močen	+	C
46	16	BAL	+	šibek	-	-
47	17	BAL	+	močen	+	B2
37	7	BAL	+	močen	+	B2
59	30	BAL	+	močen	+	B2, C

Legenda:

- negativen rezultat

+ pozitiven rezultat

NŽ- nosno žrelo

BAL- bronhoalveolarni izpirek (angl.: bronchoalveolar lavage)

n-PCR- dvostopenjska verižna reakcija s polimerazo (angl.: nested polymerase chain reaction)

PCR Adenovirus Consensus[®]- PCR-hibridizacijski-encimskoimunski test (angl.: *PCR-hybridization-immunoenzymatic assay*)

Z metodo PCR Adenovirus Consensus[®] smo dobili 6 pozitivnih rezultatov od 10, ki smo jih določili z metodo n-PCR. Od 6 pozitivnih rezultatov kužnin iz zgornjih dihal smo jih sedaj določili 3, od 4 pozitivnih rezultatov kužnin iz spodnjih dihal pa smo jih z metodo PCR Adenovirus Consensus[®] določili 3. Kužninam, pri katerih smo po reakciji PCR Adenovirus Consensus[®] dobili pozitiven rezultat, smo nato določili še vrsto. Pri 2/6 kužnin smo določili vrsto B1, pri 2/6 vrsto B2 in pri 1/6 kužnin vrsto C. Dokazali smo tudi dve vrsti v eni kužnini - B2 in C. To je bila kužnina iz spodnjih dihal. V kužninah iz zgornjih dihal je prevladovala vrsta B1, v kužninah iz spodnjih dihal pa vrsta B2.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Virusne okužbe dihal

Virusne okužbe dihal so pomemben vzrok obolevnosti in smrtnosti po vsem svetu. Ocenjujejo, da so bolezni dihal pomemben vzrok smrti pri otrocih, mlajših od 5 let. Vnetja dihal so tudi najpomembnejši vzrok za obisk otrok pri zdravniku tako v svetu kot tudi pri nas. Obolevnost je največja v hladnejšem delu leta. Virusi povzročajo akutne okužbe spodnjih dihal pri 20 do 30 % obolelih otrok. RSV povzroči približno polovico teh okužb, sledijo Adv, VI in virusi parainfluence (VPI). Številni drugi virusi, kot npr. RV in hMPV, lahko povzročijo vnetje spodnjih dihal, v redkih primerih pa tudi več virusov hkrati (Hogg, 1999).

Večina otrok, obolelih za virusnimi respiratornimi okužbami, razvije znake in simptome vnetja zgornjih dihal in ozdravi hitro. V težjih primerih se lahko pri otroku pojavi povišana telesna temperatura, bronhitis ali celo pljučnica, ne pojavi pa se zapora dihalnih poti. Pri redkih lahko virusna okužba povzroči sindrom, podoben astmi. Gre za vnetje zgornjih dihal in zaporo spodnjih dihalnih poti zaradi bronhiolitisa. Večina otrok preboli akutni bronhiolitis brez hujših zapletov in posledic. Opazili pa so, da se pri otrocih, ki imajo v zgodnjem otroštvu pogosto bronhiolitise, ki jih povzročajo hMPV, RV, Adv in drugi virusi, razvijejo stalne zapore dihalnih poti (Fjaerli in sod., 2005). Zelo verjetno je to posledica perzistentne in/ali latentne virusne okužbe (Maček in sod., 1994).

Obstruktivna pljučna bolezen predstavlja resno oviro za normalen razvoj otroka. Klinične materiale teh otrok navadno v laboratoriju pregledamo z neposredno imunofluorescenco, ki je hitra, a slabše občutljiva metoda. Čeprav je za strokovno dejavnost imunodetekcija virusnih antigenov primerna, ker je hitra, ostane večkrat povzročitelj te bolezni nepojasnen. Zato smo se odločili, da z natančnejšo metodo določimo nekatere respiratorne viruse v dihalih otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Omejili smo se na Adv, RV in hMPV. Za določanje teh virusov smo uporabili metodo PCR. Predvsem jo uporabljamo, ko pri kroničnih boleznih iščemo morebitnega virusnega povzročitelja ali pa če kljub

negativnim rezultatom, ki jih dobimo z drugimi diagnostičnimi metodami, klinična slika kaže, da je etiološki dejavnik eden od respiratornih virusov. Če v slednjem primeru nato dobimo z metodo PCR pozitiven rezultat, si to razlagamo tako, da smo klinični material dobili v času, ko je virus latenten ali smo kužnino dobili prepozno, da bi lahko dokazali infektivni virus ali njegove antigene. Z metodo PCR lahko tako ugotovimo virusno etiologijo 2-krat pogosteje kot z dokazom antigena s hitrimi metodami in/ali poskusom osamitve virusa na celični kulturi (Kusel in sod., 2006). PCR je primerna tudi za vsakodnevno diagnostiko RV in hMPV, saj le-ti počasi in slabo uspevajo na celičnih kulturah. Zaenkrat jih tudi ne moremo določiti s hitrimi metodami. Z metodo PCR neposredno določamo virusni genom v kliničnih materialih.

5.1.2 Osamitev, pomnoževanje in detekcija adenovirusov, rinovirusov in človeškega metapneumovirusa

Klinični materiali so bili brisi nosnega žrela, bronhoalveolarni izpirki in aspirati bronhijev otrok z obstruktivno pljučno boleznijo, starih od 4 mesecev do 16 let. Kužnine so bile odvzete v različnih mesecih v obdobju od leta 2003 do vključno leta 2005. Klinični materiali so bili do preiskave shranjeni v tekočem gojišču pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Osamitev DNA Adv ter RNA RV in hMPV smo izvedli s komercialnimi kompleti po navodilih proizvajalca. Z osamitvijo DNA in RNA nismo imeli posebnih težav, saj smo jo izvajali po že večkrat preizkušenih protokolih. Le pri osamitvi RNA smo morali paziti, da smo vse postopke v opisanem protokolu pod točko 3.2.3. izvajali hitro in pri sobni temperaturi. RNA je namreč zelo občutljiva molekula in hitro razpade pod vplivom RNaz in temperature. Za pomnoževanje odseka genoma Adv, RV in hMPV smo uporabili razmerje sestavin reakcijske mešanice in pogoje reakcije PCR, ki so navedeni v preglednicah 3.3 - 3.8, in so bili prav tako že večkrat preizkušeni. Za pomnoževanje 142 bp dolgega odseka gena za hekson pri Adv smo uporabili metodo nested PCR. Gre za dvostopenjsko verižno reakcijo s polimerazo. Po pomnoževanju z zunanjimi začetnimi oligonukleotidi smo izvedli še reakcijo pomnoževanja z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. Pomnoževali smo DNA, nastalo pri klasičnem PCR in na ta način povečali specifičnost pomnoževanja in zmanjšali pojav lažno pozitivnih rezultatov prvega PCR, ki so lahko posledica nastanka nespecifičnih pridelkov. Za dokazovanje RV in hMPV smo uporabili metodo RT-PCR, saj gre za virusa

z RNA. V eni reakciji sta tako združeni reverzna transkripcija in pomnoževanje DNA. Tako smo se izognili morebitni kontaminaciji med obema reakcijama, če bi ju izvajali ločeno. Pri RV smo pomnoževali 380 bp dolg odsek 5' nekodirajoče regije (5'-NCR), pri hMPV pa 450 bp dolg odsek gena za fuzijski protein (F). Uspešnost pomnoževanja smo nato dokazovali z elektroforezo v agaroznem gelu. Slike 4.1-4.3. prikazujejo pomnoževanje tarčnega odseka genoma Adv z metodo n-PCR ter odseka genoma RV in hMPV z metodo RT-PCR.

Pri dokazovanju virusnih nukleinskih kislin z metodo PCR ne smemo spregledati možnosti pojava lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Lažno pozitivni rezultati so posledica visoke občutljivosti same metode. Do njih lahko pride zaradi kontaminacije enega vzorca z drugim ali pa zaradi kontaminacije s predhodnimi pridelki enake reakcije PCR. Zato v reakcijo vedno vključujemo poleg pozitivne kontrole, s katero zagotavljamo ustreznost metode, tudi negativno kontrolo. Negativne kontrole so bile v vseh reakcijah negativne, zato smo predvidevali, da ni prišlo do kontaminacije vzorcev. Reakcije pomnoževanja so potekale uspešno, saj so se vedno pomnožile tudi pozitivne kontrole. Pomembni pa so tudi lažno negativni rezultati. Ti so lahko posledica številnega odtajevanja in zamrzovanja kliničnega materiala, zaradi česar pride do razgradnje nukleinske kisline.

Ugotovili smo, da se Adv, RV in hMPV nahajajo tako v spodnjih kot v zgornjih dihalih otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Preglednici 4.1. in 4.2. prikazujeta viruse v kliničnih materialih teh otrok. Od 63 pregledanih kužnin smo največkrat določili Adv - v 10/63 (15,8 %) kužnin, v 5/63 (7,9 %) kužnin smo določili hMPV, RV pa smo določili le v 3/63 (4,7 %) kužnin (Preglednica 4.3.). Skupni delež okuženih otrok z Adv ali s hMPV, ki smo ga določili, je primerljiv z drugimi študijami po svetu (Jartti in sod., 2002; Stralio in sod., 2004). Delež okuženih otrok z RV pa je nižji (Lemanske in sod., 2003). Kužnine, v katerih smo dokazali viruse, so bile večinoma iz zgornjih dihal. V raziskavo je bilo vključenih 34 otrok, 20 (58,8 %) od teh je bilo moškega spola, 14 (41,2 %) pa ženskega. Razmerje med bolniki moškega in ženskega spola, ki smo jim dokazali katerega od virusov, je bilo v prid slednjim (1:1,15), čeprav naj bi bili okužbam z respiratornimi virusi bolj podvrženi moški (Williams in sod., 2004). Za posamezen virus pa je bilo razmerje deklice/dečki za Adv 6/3, za RV 2/1, za hMPV 2/3. Ker so ta razmerja za posamezen virus

različna, ne moremo reči, da je spol značilno povezan z okužbo z virusi. Pri enem otroku smo dokazali Adv v kužnini iz zgornjih in spodnjih dihal. Deček je bil star eno leto. Samo pri enem otroku smo ugotovili sočasno okužbo z dvema različnima virusoma. To sta bila Adv in RV. Deček je bil star 2 leti. Oba virusa smo dokazali v spodnjih dihalih. V številnih študijah so pokazali, da prihaja do sočasnih okužb z Adv in RV (Aberle in sod., 2005; Druce in sod., 2005). Otroci z dvojno okužbo naj bi imeli težji potek bolezni (Pitrez in sod., 2005), čeprav nekateri to zanikajo (Papadopoulos in sod., 2002). Kužnine, ki so imele po reakciji PCR pozitiven rezultat za posamezen virus, so bile odvzete večinoma izven sezone pojavljanja respiratornih virusov, zato bi lahko pomislili, da gre za latentno okužbo. Znano pa je, da se ti virusi po preboleli okužbi še dalj časa izločajo in lahko perzistirajo v dihalih bolnikov. Adv npr. lahko še več let najdemo v tonzilah (Pichler in sod., 2001). Zato bi bilo potrebno preučiti ali gre res za latentno in/ali perzistentno okužbo, saj naj bi le-ta bila pomembna v razvoju obstruktivne pljučne bolezni. V študiji Pichlerja in sod. (2001) namreč niso dokazali Adv v dihalih otrok s to boleznijo. V našo raziskavo vključene kužnine so bile pregledane tudi z direktno imunofluorescenco, vendar v večini primerov ni bil odkrit noben virus. Možno je, da vsebujejo tako nizko koncentracijo virusa, da je pod detekcijsko zmogljivostjo same metode.

5.1.3 Določanje vrst adenovirusov v kužninah, ki so imele po reakciji nested-PCR pozitiven rezultat, z metodo PCR Adenovirus Consensus[®]

Vzorcem s pozitivnim rezultatom, dobljenim z reakcijo n-PCR, smo želeli določiti še vrsto z metodo PCR Adenovirus Consensus[®]. Izvedli smo reakcijo PCR, v kateri smo uporabili za pomnoževanje skupinsko značilne začetne oligonukleotide, skladne z odsekom gena VA RNA. Reakcija je potekala z vročo začetno temperaturo (95 °C). Na ta način smo se izognili nespecifičnemu spajanju začetnih oligonukleotidov pred prvim pomnoževanjem s polimerazo. Reakcijsko mešanico smo tako najprej izpostavili začetnemu razdvajanju pri 95 °C za 15 minut, da so razpadle vse naključno nastale dvoverižne vijačnice, hkrati pa se je aktivirala polimeraza, ki je Hot Start Taq[™] DNA polimeraza.

V reakcijo smo vključili pozitivno kontrolo, s katero smo preverjali možno inhibicijo pomnoževanja. Dobili smo jo v kompletu. To je plazmid, ki vsebuje Adv zaporedja,

komplementarna začetnim oligonukleotidom. Vzorce smo pomnoževali tudi v inhibitorski reakcijski mešanici, s katero smo ugotavljali inhibitorje, ki bi lahko motili pomnoževanje DNA. Kot negativno kontrolo smo uporabili ddH₂O. Po končani reakciji pomnoževanja smo analizirali pridelke PCR s hibridizacijo v mikrotiterski ploščici z biotinizirano skupinsko sondo. Nastale hibride (Adv DNA in sonda) smo detektirali z metodo ELISA. Pomnoževanje in detekcijo s hibridizacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca, ki so opisana pod točkama 3.2.7.1 in 3.2.7.2.. V hibridizacijsko reakcijo smo vključili vse vzorce, ki smo jih pomnoževali, vključno s pozitivno in negativno kontrolo, saj smo le tako lahko preverili, če je reakcija PCR potekala pravilno. Da smo zagotovili uspešnost hibridizacije, smo vključili še detekcijsko negativno kontrolo, ki je v kompletu. Le-ta nam je služila za izračun mejne vrednosti (cut-off). Po končanem testu smo izmerili OD pri 450 nm, izvedli smo validacijo in določili rezultate (točka 3.2.7.2.2.). Ker je test glede na posamezne vrednosti in izračune potekal pravilno, je sledila izvedba hibridizacije z uporabo biotiniziranih, vrstno značilnih sond, s katerimi smo določili posamezne vrste Adv (točka 3.2.7.3.).

Od 10 pozitivnih vzorcev, določenih z metodo n-PCR, smo jih z metodo PCR Adenovirus Consensus[®] potrdili le 6 (60 % ujemanje). Vabretova in sod. (2004) navajajo, da je metoda PCR Adenovirus Consensus[®] občutljivejša kot metoda PCR, v kateri pomnožujemo odsek gena za hekson. Nasprotno pa so Echavarriaova in sod. prišli do ugotovitve, da naj bi bila metoda PCR Adenovirus Consensus[®] manj občutljiva. Dokazali pa so tudi, da lahko večkratno odtajevanje in zamrzovanje vzorcev vpliva na to, da ni prišlo do enakih rezultatov. Reakcijo PCR Adenovirus Consensus[®] so namreč izvedli, ko so bili vzorci z osamljeno DNA že vsaj enkrat zamrznjeni pri -70 °C. DNA se lahko v procesu odtajevanja razgradi, zato lahko pride do lažno negativnih rezultatov, še posebej, če je v vzorcu koncentracija nukleinske kisline nizka. Ugotovili so, da so vzorci z nižjo koncentracijo DNA manj stabilni po večkratnem odtajevanju in zamrzovanju, kot pa vzorci z višjo koncentracijo DNA. Zaključili so, da je pri interpretaciji rezultatov potrebna previdnost, če gre za vzorce z nizkim virusnim bremenom in so ti bili že večkrat odtajani (Echavarria in sod., 2006). Na ta način bi si lahko tudi mi razložili neskladnost rezultatov obeh metod. Nekateri klinični materiali otrok so bili namreč že vsaj 3 leta zamrznjeni pri -70 °C, kar vpliva na samo obstojnost nukleinske kisline. Glede na jakost sevanja odsekov DNA na

elektroforeznem gelu (Slika 4.3.) po reakciji n-PCR lahko sklepamo, da se je nekaj podobnega kot pri Echavarríaovi in sod. zgodilo tudi pri nas. Odseki DNA, ki so šibko sevali na elektroforeznem gelu, so pripadali vzorcem, ki so bili z metodo PCR Adenovirus Consensus[®] negativni. Nasprotno pa so vzorci z močno sevajočimi odseki DNA dali pozitiven rezultat.

Kužninam, ki so imele po reakciji PCR Adenovirus Consensus[®] pozitiven rezultat, smo določili še vrsto. Določili smo vrste B1, B2 in C. Dokazali smo tudi dve vrsti v eni kužnini, B2 in C. Šlo je za kužnino iz spodnjih dihal (Preglednica 4.3.). Rezultati so skladni z dejstvom, da okužbo dihal najpogosteje povzročajo serotipi iz vrst B in C. V splošnem naj bi bile okužbe zgornjih dihal pri otrocih povezane z vrsto C, okužbe spodnjih dihal pa z vrsto B. Vrsto B1 smo dokazali v zgornjih dihalih, vrsto B2 pa v spodnjih dihalih. Vrsto C smo detektirali v eni kužnini iz zgornjih dihal in skupaj z vrsto B2 v spodnjih dihalih enega otroka. Navadno naj ne bi prihajalo do dvojne okužbe z različnima vrstama virusa. V študiji Echarriaove in sod. (2006) so našli enak primer. Dve vrsti bi lahko ostali neodkriti, če ne bi uporabili molekularne metode za detekcijo. Navadno se namreč tipizacija izvaja z nevtralizacijo, ki sledi pomnoževanju virusa na celičnih kulturah. Dvojno okužbo bi detektirali le, če bi se virusa pomnoževala enako učinkovito. Navzočnost dveh vrst v enem kliničnem materialu je neobičajno odkritje, zato bi bile v prihodnosti potrebne raziskave na tem področju.

5.1.4 Zaključek

V naši raziskavi smo ugotovili, da se Adv, RV in hMPV nahajajo predvsem v zgornjih in tudi v spodnjih dihalih otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Pričakovali smo več pozitivnih rezultatov za posamezen virus, zato ne moremo izključiti možnosti, da je prišlo do razgradnje nukleinske kisline v vzorcu zaradi dolgotrajnega hranjenja pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ker lahko z metodo PCR detektiramo le virusno nukleinsko kislino, bi bilo dobro pregledati kužnine teh otrok še s poskusom osamitve virusa na celičnih kulturah. Tako bi ugotavljali, ali so imeli otroci v času odvzema v dihalih infektiven virus. Za Adv je bil ta poskus že opravljen (Rade, 2005). Isti ali enak poskus bi bilo potrebno izvesti še za dokaz RV in hMPV. Prepoznavanje obstruktivne pljučne bolezni je zahtevno. Prav tako je še veliko nejasnega o samem mehanizmu bolezni in pomenu virusov pri njenem nastanku. Poleg

Adv, RV in hMPV so lahko v dihalih teh otrok še drugi virusi. PCR je zelo občutljiva in hitra metoda, zato dobiva vedno večji pomen v diagnostiki virusnih respiratornih okužb. V diplomskem delu smo pokazali, da je metoda PCR primerna za določanje virusov v kužninah iz dihal.

5.2 SKLEPI

- Metoda PCR je primerna za določanje respiratornih virusov v zgornjih in spodnjih dihalih otrok z obstruktivno pljučno boleznijo.
- Adenoviruse, rinoviruse in človeški metapnevmovirus smo dokazali predvsem v zgornjih dihalih, redkeje v spodnjih dihalih.
- Pri enem otroku smo v spodnjih dihalih določili sočasno dva različna virusa – rino- in adenovirus.
- V kužnini iz spodnjih dihal smo določili dve vrsti adenovirusov (B2 in C). Pojav dveh vrst hkrati je neobičajen.

6 POVZETEK

Virusne okužbe dihal so najpomembnejši vzrok za obisk otrok pri zdravniku tako v Sloveniji kot v svetu. Akutna virusna okužba spodnjih dihal se najpogosteje klinično izrazi kot akutni bronhiolitis. Ob prebolevanju le-tega otrokom v prsih piska. Pri nekaterih otrocih se epizode piskanja v prsih ponavljajo, vendar jih kasneje le peščica razvije astmo. Menijo, da lahko nekateri virusi perzistirajo v spodnjih dihalih še več let po prvi epizodi akutnega bronhiolitisa in tako prispevajo k nastanku obstruktivne pljučne bolezni, ki predstavlja resno oviro za normalen razvoj otroka. V diplomski nalogi smo želeli določiti DNA adenovirusov (Adv) in RNA rinovirusov (RV) ter človeškega metapneumovirusa (hMPV) v kužninah iz zgornjih in spodnjih dihal otrok z obstruktivno pljučno boleznijo.

Za dokazovanje DNA Adv smo uporabili dvostopenjsko verižno reakcijo s polimerazo (n-PCR), za dokazovanje RNA RV in hMPV pa enostopenjsko verižno reakcijo s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR). Pregledali smo 63 kužnin (30 iz zgornjih in 33 iz spodnjih dihal) 34 otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Od 63 pregledanih kužnin smo Adv dokazali skupno v 10/63 (15,8 %) kužnin, RV v 3/63 (4,7 %) kužnin in hMPV v 5/63 (7,9 %) kužnin. Kužnine, v katerih smo dokazali viruse, so bile večinoma iz zgornjih dihal. Samo pri enem otroku smo ugotovili sočasno okužbo z dvema različnima virusoma – Adv in RV. Kužninam, ki so imele po reakciji n-PCR pozitiven rezultat na Adv, smo želeli določiti vrsto z metodo PCR Adenovirus Consensus[®]. Ujemanje metod je bilo 60 % v prid n-PCR. Vzorcem, ki so dali pozitiven rezultat z metodo PCR Adenovirus Consensus[®], smo nato določili vrsto. Določili smo vrste B1, B2 in C. Dokazali pa smo tudi dve vrsti Adv (B2 in C) v kužnini iz spodnjih dihal. Pojav dveh vrst virusa hkrati je neobičajen.

V raziskavi smo ugotovili, da se Adv, RV in hMPV nahajajo predvsem v zgornjih in tudi v spodnjih dihalih otrok z obstruktivno pljučno boleznijo. Na podlagi rezultatov pa ne moremo potrditi, da so navzoči virusi obvezni za nastanek bolezni, niti ne, da so kakorkoli vpleteni v njen razvoj. Predpostavljamo, da so lahko poleg Adv, RV in hMPV v dihalih teh otrok še mnogi drugi virusi.

7 VIRI

- Aberle S. W., Aberle J. H., Steininger C., Matthes-Martin S., Pracher E., Popow-Kraupp T. 2003. Adenovirus DNA in serum of children hospitalized due to an acute respiratory adenovirus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 187: 311-314
- Aberle J. H., Aberle S. W., Pracher E., Hutter H. P., Kundi M., Popow-Kraup T. 2005. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 24: 605-610
- Allard A., Girones R., Juoto P., Wadell G. 1990. Polymerase chain reaction for the detection of adenoviruses in stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2859-2867
- Alto A. W. 2004. Human metapneumovirus: a newly described respiratory tract pathogen. *Journal of the American Board of Family Practice*, 17: 466-469
- Alvarez R., Tripp R. A. 2004. The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice. *Journal of Virology*, 79: 5971-5978
- Andreoletti L., Lesay M., Deschildre A., et al. 2000. Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *Journal of Medical Virology*, 61: 341-346
- Anzueto A., Niederman M. S. 2003. Diagnosis and treatment of rhinovirus respiratory infections. *Chest*, 123: 1664-1672
- Avellón A., Pérez P., Aguilar J. C., Lejarazu R., Echevarría J. E. 2001. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 92: 113-120
- Avšič Županc T. 2002. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 119-128

- Bastien N., Normand S., Taylor T., Ward D., Peret T. C. T., Boivin G., Anderson L. J., Li Y. 2003. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. *Virus Research*, 93: 51-62
- Biacchesi S., Skiadopoulos M. H., Boivin G., Hanson C. T., Murphy B. R., Collins P. L., Bucholz U. J. 2003. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*, 315: 1-9
- Biacchesi S., Skiadopoulos M. H., Yang L. J., Lamirande E. W., Tran K. C., Murphy B. R., Collins P. L., Buchholz U. J. 2004. Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: Deletion of G yields a promising vaccine candidate. *Journal of Virology*, 78: 12877-12887
- Boivin G., Abed Y., pelletier G., Ruel L., Moisan D., Cote S., Peret T. C., Erdman C. C., Anderson L. J. 2002. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *Journal of Infectious Diseases*, 186: 1330-1334
- Boivin G. 2005. Update on human metapneumovirus (hMPV). Quebec City, Research Center in Infectious Diseases, Laval University. http://www.aphl.org/conferences/infections_diseases_conference/files/Thursday/Respiratory_Diseases/Hzman_Metapneumovirus.pdf (10. april 2007): 32 str.
- Bouscambert-Duchamp M., Lina B., Trompette A., Moret H., Motte J., Andreoletti L. 2005. Detection of human metapneumovirus RNA sequence in nasopharyngeal aspirates of young children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1411-1414
- Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. 2001a. Adenoviruses. V: Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. Jawetz, Melnick & Aldelberg' s medical microbiology. 22nd ed. New York, Lange Medical Books: 374-384

- Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. 2001b. Picornaviruses (Enterovirus & Rhinovirus groups). V: Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. Jawetz, Melnick & Aldelberg' s medical microbiology. 22nd ed. New York, Lange Medical Books, 444-459
- Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. 2001c. Picornaviruses (Enterovirus & Rhinovirus groups). V: Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A. Jawetz, Melnick & Aldelberg' s medical microbiology. 22nd ed. New York, Lange Medical Books, 694
- Bucholz U. J., Biacchesi S., Pham Q. N., Tran K. C., Yang L., Luongo C. L., Skiadopoulos M. H., Murphy B. R., Collins P. L. 2005. Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *Journal of Virology*, 79: 6588-6597
- Cabello C., Manjarezz M. E., Olivera R., Villalba J., Valle L., Paramo I. 2006. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico city. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 21-24
- Chmielewicz B., Nitsche A., Schweiger B., Ellerbrok H. 2005. Development of a PCR-based assay for detection, quantification and genotyping of human adenoviruses. *Clinical Chemistry*, 51: 1365-1373
- Chuang Y., Chiu C., Wong K., Huang J., Huang Y., Chang L., Lin T. 2003. Severe adenovirus infection in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 36: 37-40
- Crowe J. E. 2004. Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 23: S215-221
- Demers A. M., Morency P., Mberyo-Yaah F., Jaffar S., Blais C., Bossi G., Pepin J. 2000. Risk factors for mortality among children hospitalized because of acute respiratory infections in Bangui, Centheal African republic. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 19: 424-432

- Dominguez O., Rojo P., de las Heras S., Folgueira D., Contreras J. R. 2005. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 24: 733-734
- Druce J., Tran T., Kelly H., Kaye M., Chibo D., Kostecki R., Amiri A., Catton M., Birch C. 2005. Laboratory diagnosis and surveillance of human respiratory viruses by PCR in Victoria, Australia, 2002-2003. *Journal of Medical Virology*, 75: 122-129
- Echavarria M., Maldonado D., Elbert G., Videla C., Rappaport R., Carballal G. 2006. Use of PCR to demonstrate presence of adenovirus species B, C or F as well as coinfection with two adenovirus species in children with flu-like symptoms. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 625-627
- Echavarria M., Sanchez J. L., Kolavic-Gray S. A., Polyak K. S., Mitchell-Raymundo F., Innis B. L., Vaughn D., Reynolds R., Binn L. N. 2002. Rapid detection of adenovirus in throat swab specimens by PCR during respiratory disease outbreaks among military recruits. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 810-812
- Englund J. A., Piedra P. A., Whimbey E. 1997. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses in immunocompromised patient. *American Journal of Medicine*, 102: 61-70
- Falsey A. R., Erdman D., Anderson L., J., Walch E. E. 2003. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *Journal of Infectious Diseases*, 187: 785-790
- Fjaerli H. O., Farstad T., Rod G., Ufert G. K., Gulbrandsen P., Nakstad B. 2005. Acute bronchiolitis in infancy as risk factor for wheezing and reduced pulmonary function by seven years in Akershus County, Norway. *BioMed Central Pediatrics*, 5: 31-31
- Freyemouth F., Vabret A., Legrand L., Etteradossi N., Lafay-Delaire F., Brouard J. 2003. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 22: 92-94
- Gavin P. J., Katz B. Z. 2002. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics*, 110: 1-8

- Greensill J., MvNamara W. D., Flanagan B., Smyth R. L., Hart C. A. 2003. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 372-375
- Hamelin M. E., Abed Y., Boivin G. 2004. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 983-900
- Hamelin M. E., Yim K., Kuhn K. H., Cragin R. P., Boukhvalova M., Blanco J. C. G., Prince G. A., Boivin G. 2005. Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. *Journal of Virology*, 79: 8894-8903
- Hayden F. G. 2001. Influenza virus and rhinovirus-related otitis media: potential for antiviral intervention. *Vaccine*, 19: S66-79
- Hayden F. G. 2004. Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Reviews in Medical Virology*, 14: 17-31
- Hogg J. 1999. Childhood viral infections and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160: S26-S28
- Huck B., Neumann-Haefelin D., Schmitt-Graeff A., Weckmann M., Mattes J., Ehl S., Falcone V. 2007. Human metapneumovirus induces severe disease and stronger innate immune response in BALB/c mice as compared with respiratory syncytial virus. *Respiratory Research*, 8: 6-6
- Jartti T., van den Hoogen B. G., Garofalo R. P., Osterhaus A. D. M. E., Ruuskanen O. 2002. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet*, 360: 1393-1394
- Jennings L. C., Anderson T. P., Werno A. M., Beynon K. A., Murdoch D. R. 2004. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital. Role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 23: 1003-1007

- Johnston S. L., pattemore P. K., Sanderson G, Smith S., Lampe F., Josephs L., Symington P., Myint S. H., Tyrrell D. A. 1995. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *British Medical Journal*, 310: 1225-1228
- Kidd A. H., Jonsson M., Garwiz D., Kajon A. E., Wermenbol A. G., Verweij M. W. 1996. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 622-627
- Kimberlin D. W. 2005. Antiviral therapies in children: has their time arrived. *Pediatric Clinics of North America*, 52. 837-867
- Koren S., Marin J. 2002. Razmnoževanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 23-35
- Koren S., Poljak M. 2002. Kemoterapija virusnih bolezni. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 143-154
- Korppi M., Kotaniemi-Syrjanen A., Waris M., Vainiopaa R., Reijonen T. M. 2004. Rhinovirus-associated wheezing in infancy: comparison with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 23: 995-999
- König B., König W., Arnold R., Werchau H., Ihorst G., Forster J. 2004. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 10: 4632-4635
- Krilov L. R. 2005. Adenovirus infection in the immunocompromised host. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24: 555-556
- Kuiken T., van den Hoogen B. G., van Riel D. A. J., Laman J. D., van Amerongen G., Sprong L., Fouchier R: A. M., Osterhaus A. D. M. E. 2004. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions through the respiratory tract. *American Journal of Pathology*, 164: 1983-1990

- Kuypers J., Wright N., Covey L., Morrow R. 2004. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real time RT-PCR. *Journal of Clinical Virology*, 33: 299-395
- Kusel M. M. H., H. de Clerc N., Holt P. G., Keadze T., Johnston S. L., Sly P. D. 2006. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 25 : 680-686
- Laham F. R., Israele V., Casellas J. M., Garcia A. M., Prugent C. M. L., Hoffman S. J., Hauer D., Thumar B., Name M. I., Pascual A., Taratutto N., Ishida M. T., Balduzzi M., Maccarone M., Jackli S., Passarino R., Gaivironsky R. AS., Karron R. A., Polack N. R., Polack F. P. 2004. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *Journal of Infectious Diseases*, 189: 2047-2056
- Lee A. J., Kim N. H., Kim S. J., Choi E. H., Lee H. J. 2005. Rapid identification of human adenovirus types 3 and 7 from respiratory specimens via multiplex type-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5509-5514
- Lemanske R. F., Jackson D. J., Gangnon R. E., Evans M. D., Li Z., Shult P. A., Kirk C. J., Reisdorf E., Roberg K. A., Anderson E. L., Carlson-Dakes K. T., Adler K. J., Gilberston-White S., Pappas T. E., DaSilva D. F., Tisler C. J., Gern J. E. 2005. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116: 571-577
- Levstek V. 1998. Perzistenca virusov v dihalih pri bolnikih z astmo. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 6-21
- Ling R., Davis P. J., Qingzhong Y., Wood C. M., Pringle C. R., Cavanagh D., Easton A. J. 1995. Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Research*, 36: 247-257
- Loens K., Goossenes H., de Laat C., Foolen H., Oudshoorn P., Pattyn S., Sillekens P., Ieven M. 2006. Detection of rhinoviruses by tissue culture and two independent

amplification techniques, nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a winter season. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 166-171

Logar K., Klemenc P., Mrvič T., Marin J. 2006. Človeški metapneumovirus, določen v kužninah otrok z boleznimi dihal. *Zdravstveni vestnik*, 75: 609-614

Maček V., Šorli J., Kopriva S., Marin J. 1994. Persistent adenoviral infection and chronic airway obstruction in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150: 7-10

Madhi S. A., Ludewick H., Abed Y., Klugman K. P., Boivin G. 2003. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-1-uninfected African infants. *Clinical Infectious Disease*, 37: 1705-1710

Maertzdorf J., Wang C. K., Brown J. B., Quinto J. D., Chu M., de Graaf M., van den Hoogen B. G., Spaete R., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. 2004. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 981-986

Maggi F., Pifferi M., Vatteroni M., Fornai C., Tempestini E., Anzilotti S., Lanini L., Andreoli E., Ragazzo V., Pistello M., Specter S., Bendinelli M. 2003. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2987-2991

Mahalingam S., Schwarze J., Zaid A., Nissen M., Sloots T., Storer J., Alvarez R., Tripp R. A. 2005. Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infection. *Microbes and Infection*, 8: 285-293

Makela M. J., Puhakka T., Ruuskanen O. 1998. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 539-542

- Martinez F. D. 1995. Asthma and wheezing in the first six years of life. *New England Journal of Medicine*, 332: 133-138
- McAdam A. J., Hasenbein M. E., Feldman H. A., Cole S. E., Offerman J. T., Riley A. M., Lieu T. A. 2004. Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *Journal of Infectious Diseases*, 190: 20-26
- McCarthy A. J., Bergin M., De Silva L. M., Stevens M. 1995. Intravenous ribavirin therapy for disseminated adenovirus infection. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 14: 1003-1004
- McKinlay A. M. 2001. Recent advantages in the treatment of rhinovirus infections. *Current Opinion in Pharmacology*, 1: 477-481
- Monto A.S., Lehman D. 1998. Acute respiratory infections (ARI) in children: prospects for prevention. *Vaccine*, 16: 1582-1588
- Morris D. J., Cooper R. J., Barr T., Bailey A. S. 1996. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *Journal of Infection*, 32: 113-117
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Hobayashi G. S., Pfaller M. A. 2002a. Adenoviruses. V: Murray P. R., Rosenthal K. S., Hobayashi G. S., Pfaller M. A. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis, Mosby: 467-473
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Hobayashi G. S., Pfaller M. A. 2002b. Picornaviruses. V: Murray P. R., Rosenthal K. S., Hobayashi G. S., Pfaller M. A. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis, Mosby: 511-521
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Hobayashi G. S., Pfaller M. A. 2002c. Paramyxoviruses. V: Murray P. R., Rosenthal K. S., Hobayashi G. S., Pfaller M. A. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis, Mosby: 523-5534
- Murray C. S., Simpson A., Custovic A. 2004. Allergens, viruses, and asthma exacerbations. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1: 99-104

- Ordás J., Boga J. A., Alvarez-Argüelles M., Villa L., Rodríguez-Dehli C., de Oña M., Rodríguez J., Melón S. 2006. Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2739-2742
- Papadopoulos N. G., Bates P. J., Bardin P. G., Papi A., Leir S. H., Fraenkel D. J., Meyer J., Lackie M., Sanderson G., Holgate S. T., Johnston S. L. 2000. Rhinoviruses infect the lower airways. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 1875-1884
- Papadopoulos N. G., Moustaki M., Tsolla M., Bossios A., Astra E., Prezerakou A., Gourgiotis D., Kafetzis D. 2002. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165: 1285-1289
- Peret T. C. T., Boivin G., Li Y., Couillard M., Humphrey C., Osterhaus A. D. M. E., Erdman D. D., Anderson L. J. 2002. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *Journal of Infectious Diseases*, 185: 1660-1663
- Pichler M., Herrmann G., Schmidt H., Ahrens P., Zielen S. 2001. Persistent adenoviral infection and chronic obstructive bronchitis in children; Is there a link. *Pediatric Pulmonology*, 32: 367-371
- Pitrez P. M. C., Stein R. T., Stuermer L., Macedo I. S., Schmitt V. M., Jones M. H., Arruda E. 2005. Rhinovirus and acute bronchiolitis in young infants. *Journal of Pediatrics*, 81: 417-20
- Poljak M. 2002. Molekularno dokazovanje virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142
- Pring-Åkerblom P., Trijssenaar F. E. J., Adrian T., Hoyer H. 1999. Multiplex polymerase chain reaction for subgenus-specific detection of human adenoviruses in clinical samples. *Journal of Medical Virology*, 5: 87-92
- Putto-Laurila A., Mertsola J., Ruuskanen O. 1999. Viral causes of tonsillitis and fever unresponsive to antibiotic therapy. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 18: 71-72

- Rade M. 2005. Poskus osamitve adenovirusov iz zgornjih in spodnjih dihal otrok z nepojasnjeno obstruktivno pljučno boleznijo. Diplomsko naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 22-25
- Rakes G. P., Arruda E., Ingram J. M., Hoover G. E., Zambrano J. C., Hayden F. G., Plattas- Mills T. A. E., Heymann P. 1999. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199: 785-790
- Raty R., Kleemola M., Melen K., Stenvik M., Julkunen L. 1999. Efficacy of PCR and other diagnostic methods for the detection of respiratory adenoviral infections. *Journal of Medical Virology*, 58: 87-92
- Rawlinson W. D., waliuzzman Z., Carter I.W., Belessis Y. C., Gilbert K. M., Morton J. R. 2003. Asthma exacerbation in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 187: 1314-1318
- Rihkanen H., Carpén O., Roivainen M., Vaheri A., Pitkäranta A. 2004. Rhinovirus in adenoid tissue. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 68: 903-908
- Rocholl C., Gerber K., Daly J., Pavia A. T., Byington C. L. 2004. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics*, 113: e51-e56
- Rotbart H. A., Hayden F. G. 2000. Picornavirus infections: a primer for the practitioner. *Archives of Family Medicine*, 9: 913-920
- Sarasini A., Percivalle E., Rovida F., Campanini G., Genini E., Torsellini M. 2006. Detection and pathogenicity of human metapneumovirus respiratory infection in pediatric Italian patients during a winter-spring season. *Journal of Clinical Virology*, 35: 59-68
- Shetty A. K., Gans H. A. M., So S., Millan M. T., Arvin A. M., Gutierrez K. M. 2000. Intravenous ribavirin therapy for adenovirus pneumonia. *Pediatric Pulmonology*, 29: 69-73

- Shike H., Shimizu C., Kanegaye J., Foley J. L., Burns J. C. 2005. Quantitation of adenovirus genome during acute infection in normal children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 24: 29-33
- Simoës E. A. F., Rieger C. H. L. 1999. RSV infections in developed and developing countries. *Infections in Medicine*, 16: Suppl G: 11-17
- Semple M. G., Cowell A., Dove W., Greensill J., McNamara P. S., Halfhide C., Shears P., Smyth R. L., Hart C. A. 2005. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases*, 191: 382-386
- Steininger C., Aberle S. W., Popow-Kraupp T. 2001. Early detection of acute rhinovirus infections by rapid reverse transcription-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 129-133
- Stockton J., Stephenson I., Fleming D., Zambon M. 2002. Human metapneumovirus as a case of community-acquired respiratory illness. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 897-901
- Straliotto S. M., Siqueria M. M., Machado V., Maia T. M. R. 2004. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 883-887
- Tsolia M. N., Psarras S., Bossios A., Audi H., Paldanius M., Gourbiotis D. 2004. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: evidence for high prevalence of viral infections. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 681- 686
- Ulbrandt N. D., Ji H., Patel N. K., Riggs M., Brewah Y. A., Ready S., Donacki N. E., Folliot K., Barnes A. S., Senthil K., Wilson S., Chen M., Clarke L., MacPhail M., Li J., Woods R. M., Coelingh K., Reed J. L., McCarthy M. O., Pfarr D. S., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M., Kiener P. A., Suzich J. 2006. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, 80: 7799-7806

- Vabret A., Gouarin S., Joannes M., Barranger C., Petitjean J., Corbet S., Brouard J., Lafay F., Duhamel J., Guillois B., Freymuth F. 2004. Development of a PCR-and hybridization-based assay (PCR Adenovirus Consensus[®]) for the detection and the species identification of adenoviruses in respiratory specimens. *Journal of Clinical Virology*, 31: 116-122
- van Benten I. J., van Drunen C. M., Koopman L. P., van Middelkoop B. C., Hop W. C. J., Osterhaus A. D. M. E. 2005. Age- and infection-related maturation of the nasal immune response in 0-2 – year-old children. *Allergy*, 60: 226-232
- van den Hoogen B. G., de Jong J. C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R. A. M., Osterhaus A. D. M. E. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine*, 7: 719-724
- van den Hoogen B. G., Bestebroer T. M., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. 2002. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*, 295: 119-132
- van den Hoogen B. G., Herfst S., Sprong L., Cane P. A., Forleo-Neto E., de Swart R. L., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. 2004. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 658-666
- Vargas S. O., Kozakewich H. P. W., Perez-Atayde A. R., McAdam A. J. 2004. Pathology of human metapneumovirus infection: insights into the pathogenesis of a newly identified respiratory virus. *Pediatric and Developmental Pathology*, 7: 478-486
- Williams J. V., Harris P. A., Tollefson S. J., Halburnt-Rush L. L., Pingsterhaus J. M., Edwards K. M., Wright P. F., Crowe J. E. J. 2004. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *New England Journal of Medicine*, 350: 443-450
- Winther B., Hayden F. G., Hendley O. 2006. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: association with symptomatic illness and effect of season. *Journal of Medical Virology*, 78: 644-650

Wyde P. R., Chetty S. N., Jewell A. M., Boivin G., Piedra P. A. 2003. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Research*, 60: 51-59

Wyde P. R., Moylett E. H., Chetty S. N., Jewell A., Bowlin T. L., Piedra P. A. 2004. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Research*, 63: 51-59

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Jožici Marin, ki me je ves čas nastajanja diplomskega dela spremljala in mi z veliko skrbnostjo nudila vso strokovno pomoč.

Zahvaljujem se dr. Evi Ružić-Sabljić za recenzijo diplomskega dela in pomembne pripombe.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko herpesvirusov in respiratornih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani za pomoč in koristne nasvete pri delu.

Hvala vsem ostalim, ki ste kakorkoli drugače pripomogli k izvedbi diplomskega dela.

Hvala tudi mojim najdražjim.