UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tamara ZRIM

DOKAZOVANJE PAREHOVIRUSOV Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tamara ZRIM

DOKAZOVANJE PAREHOVIRUSOV Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

DETECTION OF PARECHOVIRUSES WITH POLYMERASE CHAIN REACTION

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Miroslav Petrovec in za recenzentko prof. dr. Tatjana Avšič Županc.

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.
Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC, univ. dipl. biol.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Podpisana Tamara Zrim se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.
Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tamara Zrim

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn

DK UDK 578.2+578.7:578.835:577.2.083(043)=163.6

KG virusi/pikornavirusi/parehovirusi/HPeV/okužbe dihal/diagnostične metode/molekularne tehnike/osamitev nukleinske kisline/verižna reakcija s polimerazo/RT-PCR/določanje nukleotidnega zaporedja

AV ZRIM, Tamara

SA PETROVEC, Miroslav (mentor)/AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije

LI 2011

IN DOKAZOVANJE PAREHOVIRUSOV Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP X, 57 str., 5 pregl., 16 sl., 1 pril., 45 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Človeški parehovirusi (HPeV), enterovirusi (EV) in človeški rinovirusi (hRV), ki jih uvrščajo v družino *Picornaviridae,* so pogosti povzročitelji okužb dihal in prebavil ter okužb osrednjega živčevja pri majhnih otrocih. Namen raziskave je bil z metodo RT-PCR v realnem času določili pogostnost pojavljanja pikornavirusnih okužb pri hospitaliziranih otrocih v Sloveniji. Želeli smo preveriti občutljivost metode RT-PCR v realnem času za dokazovanje HPeV okužb s komercialno dostopnim kompletom reagentov (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija). Zanimalo nas je tudi, kateri genotipi HPeV prevladujejo pri hospitaliziranih otrocih v Sloveniji, zato smo določili del nukleotidnega zaporedja (5' nekodirajoča regija) HPeV. V raziskavo smo vključili 118 vzorcev dihal in likvorjev, ki so bili v obdobju med februarjem 2007 in januarjem 2010 poslani v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo. Iz zmrznjenih shranjenih vzorcev smo osamili celokupne nukleinske kisline ter tarčni del gena (5' nekodirajoča regija) pomnožili z RT-PCR v realnem času. RNA pikornavirusov smo potrdili v 24,6 % (29/118) (0,9 % HPeV; 12,7 % EV; 11,0 % hRV) vzorcih. RNA HPeV smo dokazali v enem vzorcu aspirata traheje pri 5 mesecev stari deklici z drugimi osnovnimi boleznimi. Analiza nukleotidnega zaporedja je pokazala, da je izolat HPeV v 98 % identičen nizozemskemu izolatu HPeV-1. Dokazali smo, da sta RT-PCR v realnem času in komercialno dostopni RT-PCR v realnem času po občutljivosti med seboj primerljivi metodi. V raziskavi smo prvič v Sloveniji dokazali okužbo dihal povzročeno s HPeV-1.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDK 578.2+578.7:578.835:577.2.083(043)=163.6
CX viruses/picornaviruses/parechoviruses/HPeV/respiratory tract infections/diagnostics/ molecular techniques/nucleic acid extraction/polymerase chain reaction/RT-PCR/nucleic acid sequence determination
AU ZRIM, Tamara
AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotehnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI DETECTION OF PARECHOVIRUSES WITH POLYMERASE CHAIN REACTION
DT Graduation thesis (Univesity studies)
NO X, 57 p., 5 tab., 16 fig., 1 ann., 45 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Human parechoviruses (HPeV), enteroviruses (EV) and human rhinoviruses (hRV) belonging to the *Picornaviridae* family are common etiological agents of respiratory and gastrointestinal tract infections and infections of central nervous system in young children. The aim of our study was to establish the incidence of picornaviruses in hospitalized Slovenian children by the real-time RT-PCR. Currently used method was compared with the commercially available (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija) real-time RT-PCR to examine the sensitivity of both methods. To establish HPeV genotypes circulating in Slovenian children nucleotide sequences of HPeV based on the part of 5' untranslated region was determined. We studied 118 respiratory and cerebrospinal fluid samples sent to the Laboratory for diagnosis of viral infections in the Institute of Microbiology and Immunology, between February 2007 and January 2010. From frozen stored samples viral RNA was extracted and target gene region (5' untranslated region) were amplified by the real-time RT-PCR. Picornaviruses were detected in 24,6% (29/118) (0,9% HPeV; 12,7% EV; 11,0% hRV) of samples. HPeV was found in one tracheal aspirate from a girl aged 5 months with underlying diseases. Analysis of nucleotide sequence of HPeV showed 98 % identity to Dutch isolate HPeV-1. We found that the real-time RT-PCR and the commercially available real time RT-PCR are comparable methods. In current study first respiratory infection with HPeV-1 in Slovenia was demonstrated.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) IV
KAZALO VSEBINE V
KAZALO PREGLEDNIC VII
KAZALO SLIK VIII
KAZALO PRILOG IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI X
1 UVOD 1
1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE 1
2 PREGLED OBJAV 3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED 3
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV 3
2.3 ZGRADBA 5
2.3.1 Genom in pomnoževanje 6
2.4 PATOGENEZA 9
2.5 EPIDEMIOLOGIJA 9
2.6 BOLEZEN IN KLINIČNA SLIKA 11
2.7 ČLOVEŠKI ENTEROVIRUSI 12
2.8 ČLOVEŠKI RINOVIRUSI 14
2.9 ZDRAVLJENJE 14
2.10 DIAGNOSTIKA 15
2.10.1 Osamitev virusa na celični kulturi 15
2.10.2 Molekularne metode 16
2.10.3 Tipiziranje 16
2.10.4 Druge diagnostične metode 17
3 MATERIALI IN METODE 18
3.1 MATERIALI 18
3.1.1 Vzorci 18
3.1.2 Preiskovanci 18
3.2 METODE DELA 19

3.2.1 Osamitev celokupne nukleinske kisline 19
3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo..... 20
3.2.2.1 Teoretične osnove 20
3.2.2.2 Pomnoževanje tarčnega odseka HPeV in hRV z RT-PCR v realnem času 25
3.2.2.3 Pomnoževanje tarčnega odseka HPeV s komercialnim kompletom..... 26
3.2.2.4 Pomnoževanje tarčnega odseka EV z RT-PCR v realnem času..... 27
3.2.2.5 Pomnoževanje tarčnega odseka HPeV s klasičnim RT-PCR..... 29
3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza 30
3.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja 30
3.2.4.1 Teoretične osnove 30
3.2.4.2 Čiščenje pridelkov PCR 31
3.2.4.3 Določanje koncentracije očiščenih pridelkov PCR 31
3.2.4.4 Sekvenčna reakcija..... 32
3.2.4.5 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije 33
3.2.4.6 Analiza nukleotidnih zaporedij 34
4 REZULTATI..... 35
4.1 VZORCI..... 35
4.2 PREISKOVANCI 37
4.3 REZULTATI RT-PCR V REALNEM ČASU..... 38
4.4 REZULTATI PRIMERJAVE DVEH METOD ZA DOKAZ PRISOTNOSTI RNA HPeV..... 41
4.5 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA 42
5 RAZPRAVA IN SKLEPI..... 43
5.1 RAZPRAVA..... 43
5.2 SKLEPI..... 49
6 POVZETEK..... 51
7 VIRI 53
ZAHVALA
PRILOGA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi in oligonukleotidne sonde uporabljene pri pomnoževanju tarčnih odsekov izbranih virusov.. 24

Preglednica 2: Reakcijska mešanica za RT-PCR v realnem času za človeški parehovirus in človeški rinovirus. 25

Preglednica 3: Prikaz stopenj reakcije RT-PCR v realnem času za pikornaviruse..... 28

Preglednica 4: Rezultati RT-PCR v realnem času na prisotnost RNA pikornavirusov 38

Preglednica 5: Vrednosti Ct za reakcije PCR in mediana za posamezne reakcije..... 38

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz taksonomske razvrstitve družine Picornaviridae (Wildenbeest in sod., 2010: 1419)..... 5

Slika 2: Virioni HPeV-1, elektronska mikrografija (Hyypiä in sod., 1992: 8848)..... 6

Slika 3: Struktura kapside in organizacija genoma pikornavirusov (Wildenbeest in sod., 2010: 1419)..... 7

Slika 4: Delež otrok pri katerih so z dokazom nevtralizacijskih protiteles ugotovili specifična protitelesa proti HPeV-1 (Tauriainen in sod., 2007: 459)..... 10

Slika 5: Shematski prikaz delovanja hidrolizirajoče sonde TaqMan (Invitrogen, 2008: 15). 22

Slika 6: Krivulja jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov reakcije PCR (Real-Time…, 2011)..... 23

Slika 7: Porazporeditev analiziranih vzorcev glede na pošiljatelje 35

Slika 8: Porazdelitev analiziranih vzorcev glede na vrsto kužnine..... 36

Slika 9: Porazdelitev analiziranih vzorcev v tri starostne skupine otrok..... 37

Slika 10: Porazdelitev analiziranih vzorcev v letu 2009..... 37

Slika 11: Število pozitivnih vzorcev glede na število vseh vzorcev za posamezno vrsto kužnine 39

Slika 12: Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost pikornavirusov za posamezno vrsto kužnine 39

Slika 13: Odstotek dokazanih okužb s pikornavirusi pri otrocih glede na spol..... 40

Slika 14: Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost pikornavirusov v posamezni starostni skupini 40

Slika 15: Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost pikornavirusov v letu 2009 41

Slika 16: Fotografija agarozne gelske elektroforeze pridelkov klasičnega enostopenjskega RT-PCR..... 42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam 118 kliničnih vzorcev testiranih z RT-PCR v realnem času

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AT	aspirat traheje
BAL	bronhoalveolarni izpirek
CPU	citopatski učinek
ddH_2O	demineralizirana destilirana voda
ddNTP	dideoksinukleotidtrifosfat
EAV	interna kontrola za pomnoževanje RNA virusov (angl. *equine arteritis virus*)
EHV1	interna kontrola za pomnoževanje DNA virusov (angl. *equine herpesvirus type 1*)
EV	človeški enterovirusi
HPeV	človeški parehovirusi
hRV	človeški rinovirusi
IC	interna kontrola (angl. *internal control*)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*)
RGD	arginin-glicin-asparaginska kislina (angl. *arginine-glycine-aspartic acid*)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. *ribonucleic acid*)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl. *reverse transcription polymerase chain reaction*)
UTR	nekodirajoče zaporedje (angl. *untranslated region*)
UKC	Univerzitetni klinični center
VP	virusna beljakovina (angl. *viral protein*)

1 UVOD

Picornaviridae so ena izmed največjih virusnih družin, ki vključujejo pomembne človeške in živalske patogene. Njihovo ime *pico* nakazuje na majhnost virusov, ki so brez ovojnice z ikozaedrično kapsido, ki ščiti ribonukleinsko kislino (angl. *ribonucleic acid*, RNA) (Murray in sod., 2005). Pomembni virusni patogeni iz družine pikornavirusov, ki povzročajo okužbe dihal, prebavil ter okužbe osrednjega živčevja so človeški parehovirusi (HPeV), enterovirusi (EV) in človeški rinovirusi (hRV) (Butel, 2010). Najpogosteje povzročajo okužbe pri majhnih otrocih, z leti pa pogostnost okužb pada. Pojavljajo se v jesenskih in spomladanskih mesecih. Nekoč so jih dokazovali s klasičnimi diagnostičnimi metodami kot je osamitev na celični kulturi, danes pa pogosteje uporabljajo molekularne metode, ki so bolj občutljive in specifične. Ustreznega zdravljena pikornavirusnih okužb za enkrat še ne poznajo (Harvala in Simmonds, 2009; Olofsson in sod., 2011).

Leta 1999 so v družino *Picornaviridae* uvrstili nov rod *Parechovirus*, ki zajema 16 genotipov. Z največjo incidenco se pojavlja genotip 1, ki je razširjen po celem svetu in pogosteje povzroča obolenja dihal in prebavil pri otrocih do tretjega leta starosti. V zadnjem času pa je veliko pozornosti pritegnil genotip 3, ki se hitro širi med populacijo otrok. Povzroča okužbe osrednjega živčevja, in sicer najpogosteje pri otrocih do enega leta starosti (Chieochansin in sod., 2011). Patogeneza okužb se med genotipi razlikuje, kar pripisujejo različnemu celičnemu tropizmu virusov (Harvala in Simmonds, 2009). Čeprav je bila v Sloveniji narejena raziskava o virusnih povzročiteljih okužb dihal pri hospitaliziranih otrocih (Uršič in sod., 2011), še ni znano kakšna je pogostnost okužb, ki jih povzročajo človeški parehovirusi.

1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je bil z metodo verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo v realnem času (angl. *real-time reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR v realnem času) ugotoviti ali del virusnih okužb dihal in osrednjega živčevja pri otrocih povzročajo človeški parehovirusi. Izbrali smo otroke do šestega leta starosti, ki so bili sprejeti na Kirurško kliniko, klinični oddelek za otroško kirurgijo in

intenzivno terapijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Prav tako nas je zanimala pogostnost okužb, ki jih povzročajo preostali pikornavirusi (enterovirusi in človeški rinovirusi).

Domnevali smo, da je pogostnost pikornavirusnih okužb v Sloveniji in drugod po svetu podobna. Pričakovali smo tudi, da bomo dokazali več okužb s pikornavirusi pri otrocih do tretjega leta starosti, in sicer pogosteje v jesenskih in spomladanskih mesecih.

Želeli smo preveriti občutljivost RT-PCR v realnem času za dokaz prisotnosti RNA človeških parehovirusov, ki smo ga na novo uvedli v laboratoriju virusnih infekcij, s komercialnim diagnostičnim kompletom reagentov.

Zanimalo nas je tudi kateri genotipi krožijo med populacijo otrok v Sloveniji, zato smo določili nukleotidna zaporedja človeških parehovirusov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Leta 1956 sta Wigand in Sabin med poletno študijo epidemije gastroenteritisa pri otrocih v Združenih državah Amerike odkrila do takrat še nepoznana virusa. Uvrstili so ju v rod *Enterovirus*, kot *Echovirus* 22 in *Echovirus* 23 (danes prototipa Harris in Willamson) (van den Sanden in sod., 2008). Že takrat so opazili, da se v nekaterih lastnostih razlikujeta od znanih EV. Na celični kulturi opičjih ledvičnih celic niso opazili sprememb, kot je to značilno za večino EV, težave so se pojavile pri pasažah, opazili pa so tudi drugačne citopatske učinke (CPU), kjer je bila vidna značilna sprememba jedra (nevidnost jedra in jedrskega kromatina). V kasnejših raziskavah so ugotovili tudi drugačno oblikovane sekundarne strukture v genomu, niso pa opazili zmožnosti prekinitve sinteze celičnih beljakovin v okuženih celicah, kot je to značilno za večino pikornavirusov (Stanway in Hyypiä, 1999).

Pred približno dvajsetimi leti so zaradi drugačnih molekularnih lastnosti predlagali uvrstitev *Echovirus* 22 in *Echovirus* 23 v nov rod. Z molekularnimi metodami so ugotovili le 30 % podobnost aminokislinskega zaporedja s preostalimi pikornavirusi. Ugotovili so tudi drugačno organizacijo virusnega genoma (van den Sanden in sod., 2008). Z metodo hibridizacije in specifično sondo, ki nalega na EV podskupine jim prav tako ni uspelo identificirati virusov. Opazili so razlike v bolezenskih znakih in epidemiologiji bolezni. Tako so leta 1999 virusa preimenovali in uvrstili v nov rod *Parechovirus*, kot človeški parehovirus genotipa 1 (HPeV-1) in človeški parehovirus genotipa 2 (HPeV-2) (Stanway in Hyypiä, 1999).

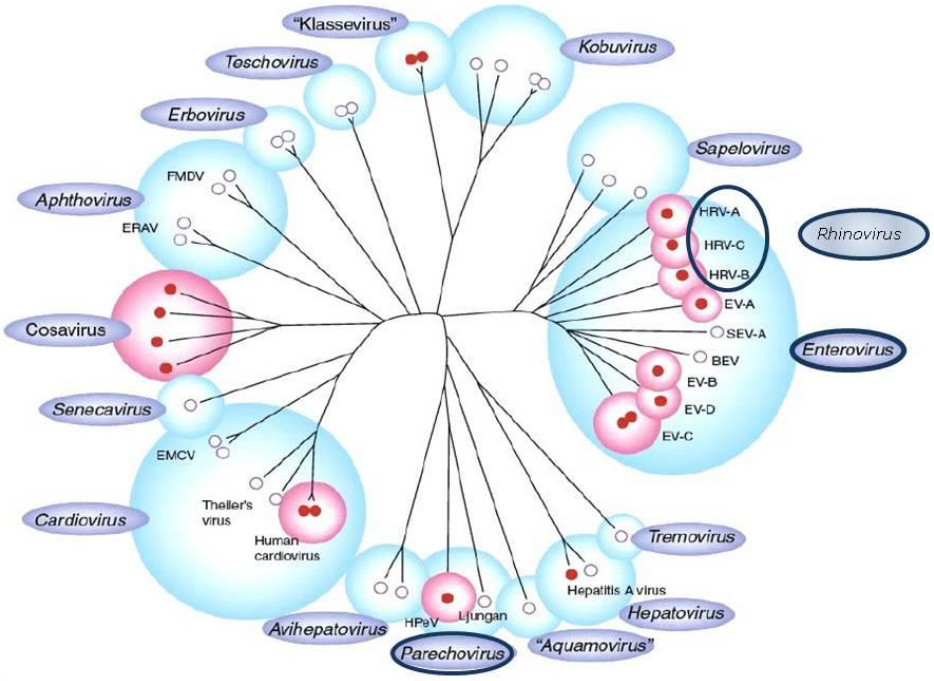
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Družina *Picornaviridae* danes vključuje 12 rodov, med katerimi so za človeka najpomembnejši: *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*. V zadnjih desetletjih se je taksonomska ureditev znotraj družine spreminjala zaradi na novo odkritih tipov, boljših molekularnih metod in filogenetskih analiz (Steyer in sod., 2011).

V rod *Parechovirus* uvrščajo dve vrsti, in sicer človeški parehovirus (HPeV) in virus Ljungan (živalski patogen). HPeV do danes zajema šestnajst genotipov (HPeV1-16), od katerih je prvih šest priznanih, preostale pa Mednarodni odbor za virusno taksonomijo (angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) še ni odobril (Steyer in sod., 2011). Število odkritih genotipov se je od leta 2004 povečalo od dveh (HPeV-1 in HPeV-2) do zaporedne številke 16 (HPeV-16), kar kaže na vse večje zanimanje in molekularno epidemiološke študije o HPeV (Chieochansin in sod., 2011).
Uvrščanje novih genotipov v taksonomski sistem temelji na podobnosti nukleotidnega zaporedja gena kapsidne beljakovine VP1 in podobnosti v aminokislinskem zaporedju. Če je podobnost v nukleotidnem zaporedju VP1 manjša ali enaka 73 % in če je podobnost v aminokislinskem zaporedju manjša ali enaka 81 % lahko potrdijo nov genotip. Ti kriteriji so v skladu s sistemom za določevanje novih EV serotipov (Nix in sod., 2010).

Rod *Enterovirus* zajema deset vrst: človeški enterovirus (EV) A – D, enterovirus primatov A, goveji enterovirus, prašičji enterovirus B ter človeški rinovirus A – C (Steyer in sod., 2011). Na novo odkrite izolate, ki so ustrezali kriterijem rodu enterovirusov, so uvrstili med coxsackieviruse ali echoviruse. Po letu 1969 so spremenili sistem poimenovanja tako, da so jih poimenovali enterovirus in dodali zaporedno številko. Tako danes poznamo več kot 200 za ljudi patogenih serotipov, ki lahko povzročajo številna bolezenska stanja (Butel, 2010).

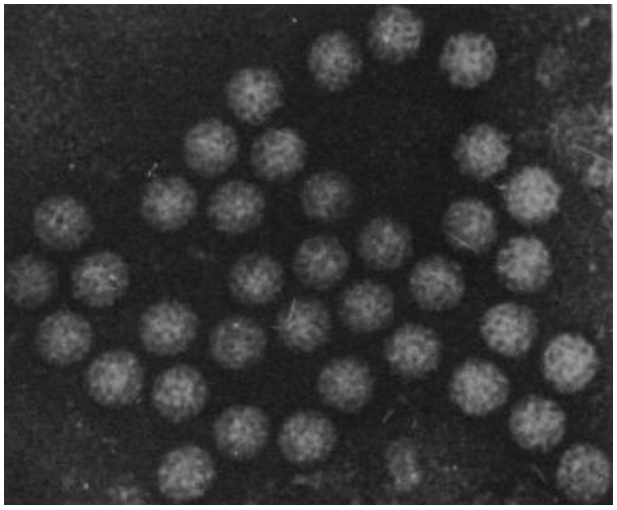
Človeški rinovirusi (hRV) so bili do leta 2005 v družini *Picornaviridae* uvrščeni v poseben rod *Rhinovirus.* Kasneje so jih na podlagi filogenetskih analiz uvrstili v rod *Enterovirus.* Danes je priznanih več kot 100 različnih serotipov, katere pogosto povezujejo z okužbami dihal (Butel, 2010; Steyer in sod., 2011).



Slika 1: Prikaz taksonomske razvrstitve družine Picornaviridae (Wildenbeest in sod., 2010: 1419)

2.3 ZGRADBA

Pikornavirusi imajo obliko ikozaedra in v premeru merijo 28 – 30 nm. Kapsida je sestavljena iz 60 protomernih enot vsake virusne beljakovine (VP1, VP3, VP4 in VP2) (Steyer in sod., 2011). HPeV imajo le tri strukturne beljakovine (VP1 VP3, VP0), ker v zadnji stopnji oblikovanja VP0 ne poteče cepitev na dve manjši beljakovini VP2 in VP4. Zaradi tega je oblika kapside nekoliko drugačna (Stanway in Hyypiä, 1999). Kristalografsko strukturo HPeV še niso določili, so pa s pomočjo elektronske mikroskopije in podobnosti s preostalimi pikornavirusi predvideli strukturo virusa (Harvala in Simmonds, 2009).



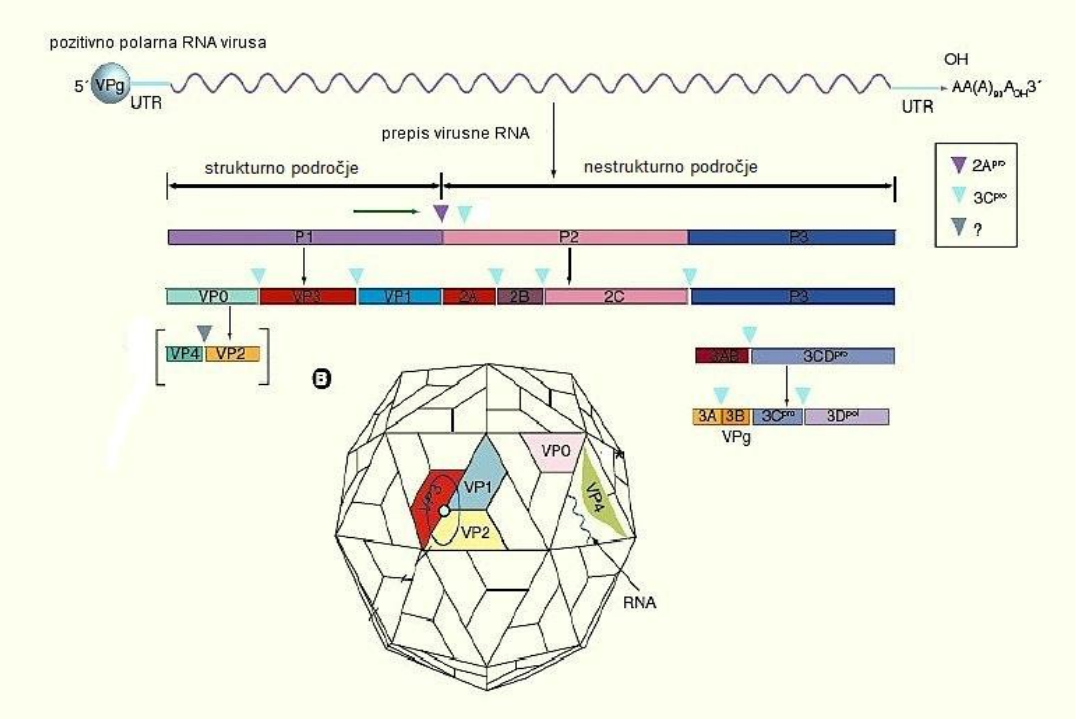
Slika 2: Virioni HPeV-1, elektronska mikrografija (Hyypiä in sod., 1992: 8848)

Pikornavirusi so brez ovojnice in so zato odporni na toploto, na organska topila ter na številne druge fizikalno-kemijske učinke. Ta morfološka značilnost jim omogoča, da preživijo zunaj gostitelja daljše časovno obdobje. Z izjemo hRV so EV in HPeV odporni tudi na nizko vrednost pH (Steyer in sod., 2011).

2.3.1 Genom in pomnoževanje

Genom HPeV je linearna molekula pozitivno polarne enovijačne RNA dolge od 7300 do 7400 baznih parov. Med dvema nekodirajočima zaporedjema (angl. *untraslated region*, UTR) na 5' koncu in 3' koncu je en sam odprti bralni okvir (angl. *open reading frame*, ORF). Na 5' UTR je vezana beljakovina VPg ter na 3' UTR poliadenilacijski rep. Kodirajoče področje se deli na tri dele:

- strukturno področje **P1**, ki kodira beljakovine kapside (VP0, VP3 in VP1) in
- nestrukturni področji **P2** (2A−2C) in **P3** (3A−3D), ki kodirata virusne proteinaze in polimeraze (Wildenbeest in sod., 2010).



Slika 3: Struktura kapside in organizacija genoma pikornavirusov (Wildenbeest in sod., 2010: 1419)

Tako organizacijo genoma najdemo pri vseh genotipih HPeV (Harvala in Simmonds, 2009). Večina beljakovin ima neposredno kodirajočo funkcijo. Podobnost HPeV beljakovin z drugimi pikornavirusi je 14 – 35 % (Stanway in Hyypiä, 1999).

Nekodirajoči odsek 5' UTR je dolg približno 700 baznih parov in je vpleten v pomnoževanje in prevajane virusne RNA. Sestavljen je iz dvanajstnih sekundarnih in terciarnih zank, ki se med pikornavirusi razlikujejo, zato to področje uporabljajo za taksonomsko uvrstitev znotraj družine. Na 3' koncu 5' UTR se nahaja IRES (angl. *internal ribosome entry site*), ki ima pomembno vlogo pri začetku prevajanja genoma na celičnih ribosomih (Stanway in Hyypiä, 1999; Wildenbeest in sod., 2010).

Nekodirajoči odsek 3' UTR ima podvojeno zaporedje sedemnajstih nukleotidov, ki je visoko ohranjeno med genotipi HPeV in se lahko oblikuje v nepopolno zanko. Po stop kodonu je odsek zelo bogat z uracilom, kar so opazili tudi pri drugih pikornavirusih. To področje je še slabo raziskano, zato bi poznavanje tega odseka doprineslo k boljšemu razumevanju vloge 3' UTR pri pomnoževanju (Al-Sunaidi in sod., 2007).

Tri strukturne beljakovine podobnih velikosti in podobno osnovno zgradbo antiparalelnega β-lista oblikujejo virusno kapsido HPeV:

- **VP0** ima na 5' koncu antigensko področje, ki ni značilno za druge pikornaviruse (Wildenbeest in sod., 2010);
- **VP3** je večji kot pri ostalih pikornavirusih, zaradi hidrofilnega podaljška na amino koncu (Seitsonen in sod., 2010);
- **VP1** je antigensko področje (Wildenbeest in sod., 2010), ki ima na 3' koncu arginin-glicin-asparaginsko kislino (angl. *arginine-glycine-aspartic acid*, RGD). Slednja sodeluje pri pritrditvi in vstopu virusa v gostiteljsko celico (Stanway in Hyypiä, 1999).

Sedem nestrukturnih beljakovin HPeV je slabo raziskanih, zato njihovo vlogo pri razmnoževanju virusa sklepajo na podlagi znane funkcije beljakovin drugih pikornavirusov.

Ob vstopu v gostiteljsko celico je virusna RNA prepisana kot en sam velik poliprotein, nakar sledi kaskada proteolitičnih cepitev z edino virusno proteazo (3C). Za dokončno obdelavo poliproteina na strukturne in nestrukturne beljakovine je potrebnih 9 cepitev (Harvala in Simmonds, 2009). Nestrukturne beljakovine se povežejo s celičnimi membranskimi kompartmenti in oblikujejo razmnoževalni kompleks. Pri oblikovanju sodeluje beljakovina z NTP-azno aktivnostjo (2C) in veže virusno RNA (Krogerus in sod., 2007). Od RNA odvisna RNA polimeraza (3D) prepiše genomsko RNA v več kopij negativno polarnih verig RNA, ki so matrica za sintezo novih pozitivno polarnih RNA. Opazili so, da beljakovina 2A nima proteolitične aktivnosti, zato HPeV ob okužbi gostiteljske celice ne prekinejo sinteze celičnih beljakovin, kot je to značilno za preostale pikornaviruse. Predvidevajo, da se veže na 3' UTR virusno RNA in na ta način sodeluje pri pomnoževanju virusa. Beljakovina VPg (3B) je kovalentno vezan na 5' UTR in je sestavljen iz 20 – 25 aminokislin ter sodeluje pri začetku prepisovanja RNA (Harvala in Simmonds, 2009).

2.4 PATOGENEZA

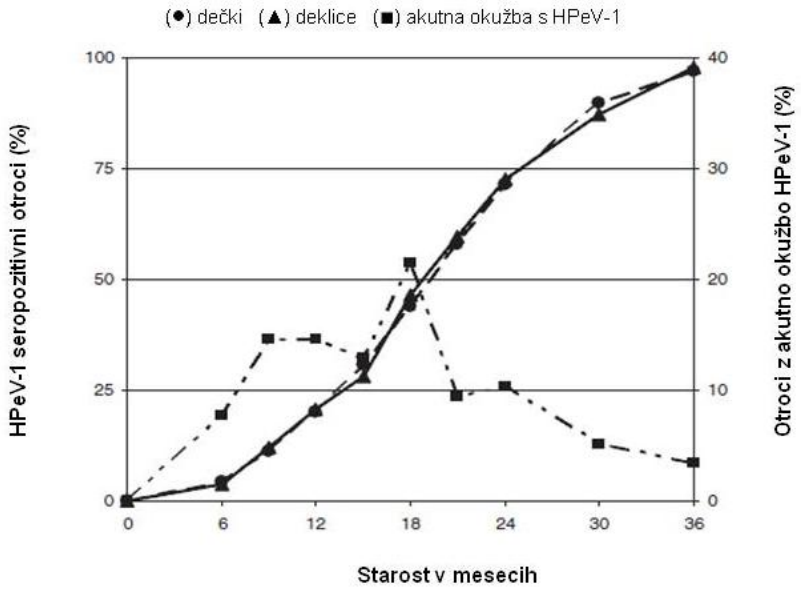
Sama patogeneza okužb s HPeV je še neznana, zaradi nezadostnega poznavanja virusnih beljakovin. Predvidevajo, da so prebavila in dihala primarni mesti pomnoževanja virusa in jih lahko z diagnostičnimi metodami dokažejo v izbrani kužnini še več tednov po pojavu kliničnih znakov (Wildenbeest in sod., 2010). HPeV se prav tako širijo po krvnem obtoku v ostale organe in povzročajo sistemske bolezni (Harvala in sod., 2010). Z uporabo alternativnih receptorjev prehajajo krvno-možgansko pregrado in povzročajo okužbe osrednjega živčevja (Harvala in Simmonds, 2009).

Večina genotipov HPeV (HPeV-1, HPeV-2, HPeV-4, HPeV-5, HPeV-6) ima RGD, ki igra ključno vlogo pri vezavi na celične integrine (αvβ1, αvβ3 in αvβ6) in ob vstopu v gostiteljsko celico. Genotipa HPeV-3, HPeV-8 in tudi nekatere različice HPeV-1 in HPeV-5 pa nimajo RGD. Na katere receptorje se vežejo in na kakšen način to spremeni patogenezo okužbe, še ni znano.

Opazili so, da se HPeV-1 in HPeV-3 razlikujeta v patogenezi, bolezenskih znakih in v starosti bolnikov. Raziskovalci so mnenja, da je možen vzrok manjkajoči RGD in posledično uporaba alternativnega receptorja, ki spremeni celični tropizem HPeV-3 in tako omogoči širjenje in pomnoževanje virusa v osrednjem živčevju. Uporaba alternativnega receptorja je možna le, če se ligandi za celične integrine, ki jih uporablja HPeV-1 ne izrazijo (Harvala in sod., 2010).

2.5 EPIDEMIOLOGIJA

Številne raziskave iz celega sveta poročajo o visoki pogostnosti okužb s HPeV pri otrocih. Najpogosteje se pojavlja HPeV-1, ki okuži večino otrok do prvega leta starosti, kar 90 % otrok do drugega leta starosti pa je bilo vsaj enkrat v stiku s HPeV-1 (Landry, 2010, Wildenbeest in sod., 2010). Na Finskem so raziskovalci z dokazom nevtralizacijskih protiteles ugotovili, da ima 20 % otrok starih dvanajst mesecev protitelesa proti HPeV-1, pri štiriindvajsetih mesecih starosti ima protitelesa 72 % otrok in pri šestintridesetih mesecih starosti ima protitelesa proti HPeV-1 98 % otrok (Tauriainen in sod., 2007).



Slika 4: Delež otrok pri katerih so z dokazom nevtralizacijskih protiteles ugotovili specifična protitelesa proti HPeV-1 (Tauriainen in sod., 2007: 459)

Na Japonskem so raziskovalci potrdili prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG proti HPeV-3 pri 85 % otrocih do petega leta starosti. Pri odraslih pa so dokazali specifična protitelesa IgG proti HPeV-3 v 87 % primerih, kar je redkeje v primerjavi s 99 % pogostnostjo prisotnosti specifičnih protiteles IgG proti HPeV-1 (Watanabe in sod., 20017). Možen vzrok za nižjo seroprevalenco med odraslo populacijo je lahko kasnejša pojavnost genotipa 3, ki se je globalno razširil med naivno oz. nezaščiteno populacijo. Materina protitelesa tako ne ščitijo novorojenčkov z nerazvitim imunskim sistemom proti okužbi s HPeV-3, kot je to značilno za HPeV-1 (Harvala in Simmonds, 2009).

Razlike v starosti pri otrocih in pojavnosti v letnem času povezujejo z okužbo z različnimi genotipi HPeV. Raziskovalci na Nizozemskem so ugotovili, da se okužbe s HPeV-1 pogosteje pojavljajo pri otrocih starih med 0 in 35 meseci s povprečno starostjo 9,2 meseca. Okužbe, ki jih povzroča HPeV-3 pa opazujejo pri otrocih starih med 0 in 15 meseci s povprečno starostjo 1,9 meseca (van den Sanden in sod., 2008). Okužba s HPeV-1 je opazna čez celo leto z največjo incidenco pozno poleti in v zgodnjih zimskih mesecih, HPeV-3 okužbe pa se pogosteje pojavljajo v poletnih mesecih (Harvala in Simmonds, 2009).

Raziskovalci so ugotovili, da se HPeV-3 pogosteje pojavlja vsako drugo leto. V Evropi poročajo o pojavnosti na soda leta (od leta 1988 naprej) (Fujs-Komloš in Poljak, 2010), v Združenih državah Amerike pa na liha leta (Renaud in sod., 2011). Oblikovali so dve hipotezi, s katerima si razlagajo zakaj sta dve leti minimalen čas, ki je potreben za izvor novih različic HPeV-3, da nato le-te lahko endemično krožijo med naivno populacijo, ki nima protiteles proti virusu. Prva hipoteza pravi, da so nove različice odvisne od genetskih sprememb na predelu gena VP3/VP1, ki so dvakrat nižje (2.83×10^{-3} na mesto na leto) kot pri HPeV-1. V drugi hipotezi pa izvor novih različic HPeV-3 pripisujejo variabilnemu področju na 3' koncu VP1, kjer pride do antigenskega odmika (angl. *drift*) (Harvala in sod., 2010; van den Sanden in sod., 2008).

2.6 BOLEZEN IN KLINIČNA SLIKA

Prva epidemija s HPeV je bila opisana pred 50 leti pri otrocih z diarejo. Od takrat poročajo o vse več različnih bolezenskih stanjih, ki jih povzročajo različni genotipi HPeV. Okužbe so pogosteje klinično blage ali celo asimptomatske. Največ pozornosti so pritegnile okužbe osrednjega živčevja, ki jih v večini primerov povzroča genotip 3 (Harvala in Simmonds, 2009).

Simptomatske okužbe s HPeV-1 se kažejo kot blage okužbe prebavil in dihal. Slednje so lahko tako okužbe zgornjih kot tudi okužbe spodnjih dihal, ki se kažejo s kliničnimi znaki pljučnice, sopenja in bronhiolitisa (Tauriainen in sod., 2008). Leta 1964 in 1965 so raziskovalci iz New Yorka prvič opisali okužbe dihal s HPeV-1. V dveh letih so ugotovili tri epidemije okužb dihal s HPeV-1 pri 18 nedonošenih otrocih. Od tega je sedem otrok imelo pljučnico, preostali pa so imeli okužbo zgornjih dihal (Berkovich in Pangan, 1968).

Okužbe, ki jih povzroča HPeV-1 povezujejo tudi z bolnišničnimi okužbami dihal pri dojenčkih in majhnih otrocih (Harvala in sod., 2008). V nekaterih primerih lahko povzročajo okužbe osrednjega živčevja, in sicer encefalitis, encefalomielitis ter sporadične primere aseptičnega meningitisa. Za tovrstne okužbe naj bi bile odgovorne različice HPeV-1, ki na virusni kapsidi nimajo RGD. Preostale bolezni, ki jih povzročajo HPeV-1 so

hemoragični uremični sindrom, miokarditis, nekrotični enterokolitis, Reyev sindrom, vnetje srednjega ušesa in vnetje očesa (Harvala in Simmonds, 2009).

Raziskava opravljena v Veliki Britaniji, poroča o sočasni okužbi HPeV z drugimi respiratornimi virusi v kar dveh tretjinah primerov. Razlagajo, da dodatna okužba s HPeV vodi k poslabšanju zdravstvenega stanja bolnika. Opazili so tudi, da je bila tretjina sočasnih okužb povezana z adenovirusi. Torej primarna okužba s HPeV lahko vodi do reaktivacije adenovirusa in posledično k ponovni okužbi dihal (Harvala in sod., 2008). Kanadski raziskovalci pa poročajo o sočasni okužbi s HPeV-1 s paramiksovirusi (respiratorni sincicijski virus in parainfluenca) (Abed in Boivin, 2006).

HPeV-3 so prvič dokazali na Japonskem leta 1999 pri enoletnem otroku s prehodno paralizo, vročino in drisko (Ito in sod., 2004). Skoraj istočasno so genotip 3 osamili v Kanadi iz aspirata nosnožrelne sluznice dojenčka z domnevno neonatalno sepso (Boivin in sod., 2005). Je drugi najpogostejši genotip HPeV, ki je v zadnjih letih postal pogost predmet raziskovanja, saj povzroča težje oblike bolezni kot so hepatitis s sindromom koagulopatije, encefalitis, meningitis, sepsi podobna bolezen in neonatalna sepsa (Harvala in sod., 2010). Iz Združenih držav Amerike so poročali o smrtnih primerih s klinično diagnozo nenadne nepojasnjene smrti dojenčka, ki so imeli okužbo s HPeV-3 (Sedmak in sod., 2010).

Bolezenski znaki, ki so posledica okužb s HPeV-1, HPeV-3 in EV so med seboj podobni. Zato le na podlagi klinične slike ne morejo določiti kateri virus oz. genotip virusa povzroča okužbo (Sedmak in sod., 2010).

2.7 ČLOVEŠKI ENTEROVIRUSI

Podobno kot HPeV se tudi EV pojavljajo z največjo pogostnostjo v poletnih in jesenskih mesecih ter so razširjeni po celem svetu. Asimptomatske okužbe so pogoste, prav tako pa povzročajo širok nabor bolezenskih stanj, vse od blagih okužb dihal do težjih oblik bolezni. Primarni način prenosa je fekalno-oralni ter preko aerosolnih kapljic. Virus se

lahko širi s kontaminirano vodo, slabi sanitarni pogoji in prenaseljenost pa sta odličen pogoj za izbruh epidemij. Najpogosteje pride do okužb pri otrocih do 5 leta starosti, z leti pa pogostnost okužb pada (Steyer in sod., 2011; Murray in sod., 2005).

Vstopna mesta virusa so usta in zgornja dihala, kjer se virus razmnožuje v sluzničnem in limfnem tkivu nebnic in žrela ter v Peyerjevih ploščah. Virus lahko do 3 dni dokažejo v kužninah dihal in približno do 6 tednov v iztrebkih, ko je količina virionov tudi največja (Steyer in sod., 2011). Kratka primarna viremija se zgodi le pri četrtini okuženih in je ponavadi asimptomatska, saj okužbo omeji humoralni imunski odziv. V preostalih primerih, ko imunski sistem ne omeji okužbe, pa sledi sekundarna viremija, torej sistemsko širjenje virusa v druge organe kot so jetra, vranica, bezgavke, kostni mozeg. Inkubacijski čas razvoja bolezni je od 1 do 35 dni (Murray in sod., 2005).

Bolezni, ki jih povzročajo EV so različne in so odvisne od serotipa virusa, tkivnega tropizma in nenazadnje od samega imunskega statusa bolnika. Pogosto lahko en serotip povzroča številna klinična stanja in hkrati več različnih serotipov enako klinično sliko (Butel, 2010). Širok spekter bolezenskih stanj sega vse od okužbe dihal, oči, kože in sluznice ter do resnejših bolezenskih stanj kot so okužba srca in osrednjega živčevja (serozni meningitis, encefalitis, neonatalna sepsa). EV v večini primerov povzročajo akutne okužbe, vendar se lahko pri imunsko oslabljenih bolnikih razvijejo tudi kronične oblike bolezni (Steyer in sod., 2011).

Imunski odziv ima pomembno vlogo pri okužbah z EV, saj lahko popolnoma omeji primarno okužbo. Protitelesa IgA se v prebavnem traktu pojavijo 2 – 4 tedne po okužbi, protitelesa IgG in IgM pa v prvih dveh tednih po okužbi. Protitelesa IgM lahko določimo še 6 – 8 tednov po okužbi, protitelesa IgG pa ostanejo več let. Slednja lahko prehajajo placento in ščitijo novorojenčke do približno šestega meseca starosti (Steyer in sod., 2011).

2.8 ČLOVEŠKI RINOVIRUSI

Okužbe s hRV se pojavljajo skozi vse leto, sicer pa več okužb opazimo zgodaj spomladi in pozno jeseni. Odgovorni so za vsaj polovico okužb zgornjih dihal. Prenašajo se iz osebe na osebo preko izločkov dihal in kontaminiranih predmetov. Glavni vir prenosa okužbe so ponavadi otroci, ki širijo virus iz vrtca in šol med družinske člane. Veliko različnih serotipov kroži na določenem geografskem območju v določenem času, navadno pa prevladuje novejša različica serotipa hRV. Manjša antigenska sprememba, ki jo povezujejo z nastajanjem novih serotipov je antigenski odmik (Steyer in sod., 2011; Murray in sod., 2005).

Vstopna mesta hRV so nos, oči in usta. Primarno se razmnožujejo na epiteliju nosne sluznice in tako povzročijo okužbo zgornjih dihal in žrela. Inkubacijski čas razvoja bolezni je od 1 do 4 dni. Za okužbo zadostuje le en virion, ki v nekaj dneh doseže koncentracijo od 500 do 1000 virionov na mililiter. Po 2 do 3 dneh močnega izločanja se količina virusa zmanjša. Pogosta klinična slika je prehlad, ki traja od 1 do 3 tednov, vse pogosteje pa jih povezujejo s težkimi oblikami okužb spodnjih dihal pri otrocih in odraslih. Vplivajo lahko na poslabšanje astme in drugih kroničnih pljučnih bolezni, povzročajo vnetje srednjega ušesa in vnetje sinusov (Steyer in sod., 2011; Murray in sod., 2005).

Ob primarni okužbi se pojavijo protitelesa IgA, ki ostanejo le kratek čas ter protitelesa IgG, ki začnejo upadati 18 mesecev po okužbi. Celično posredovana imunost nima velikega pomena pri okužbah s hRV, saj je imunost le prehodna in ne varuje pred drugimi serotipi hRV (Murray in sod., 2005).

2.9 ZDRAVLJENJE

Učinkovito sistemsko zdravljenje težjih oblik okužb s HPeV, hRV in EV še ni znano. Raziskovalci poročajo o zdravljenju okužb, ki jih povzročajo hRV in EV z zdravili, ki se vežejo na kapsido virusa in s tem onemogočajo vezavo na gostiteljsko celico ter nadaljnje slačenja virusa. Taka zdravila so še v razvoju in jih v redni praksi še ne uporabljajo (Wildenbeest in sod., 2010).

Novejše zdravljenje EV okužb je z intravenoznim vnosom imunoglobulinov (IVIg), ki je učinkovito tudi pri osebah z oslabljenim imunskih sistemom. Primerjali so zdravljenje dvojčkov s hepatitisom in neonatalno sepso, ki sta bila okužena s HPeV-3. En otrok je dobival zdravilo v obliki IVIg in je okreval. Drugemu otroku pa so dajali neučinkovito zdravilo (aciklovir), zaradi katerega se zdravstveno stanje otroka ni izboljšalo. Sklepajo, da je zdravljenje v obliki IVIg učinkovito tudi pri okužbah s HPeV (Wildenbeest in sod., 2010).

Predlagajo tudi razvoj zdravljenja z monoklonskimi protitelesi, saj je ta oblika uspešna pri zdravljenju nekaterih virusnih okužb. Sicer je ta način bolj primeren za zdravljenje okužb s HPeV kot EV, saj bi bilo težko oblikovati protitelesa za več kot 100 različnih serotipov (Wildenbeest in sod., 2010).

2.10 DIAGNOSTIKA

Dokazovanje HPeV v rutinski diagnostiki uporabljajo le v redkih laboratorijih, zato je dejanska razširjenost virusnih okužb podcenjena (Harvala in Simmonds, 2009). Še vedno se za dokazovanje virusov v večini laboratorijev uporablja osamitev na celičnih kulturah (Harvala in sod., 2010).

2.10.1 Osamitev virusa na celični kulturi

Celične linije, ki jih uporabljajo za selektivno rast HPeV so Vero, LLC, BSC-1, tMK (izvirajo iz celic normalnih opičjih ledvic) in Caco-2, HT29, RD, HeLa, (izvirajo iz celic človeških malignih tumorjev). Za hitro in uspešno zdravljenje bolnikov, predvsem pri težjih oblikah bolezni, je ta metoda časovno zamudna in manj občutljiva, saj se HPeV razmnožujejo počasi in lahko kultivacija traja več tednov. Na voljo ni ustreznega »*in vivo*« sistema za razmnoževanje vseh genotipov HPeV, specifična protitelesa proti virusnim antigenom pa so na voljo le za genotip 1 in 2. Pri okužbah osrednjega živčevja je osamitev

na celičnih kulturah manj občutljiva, saj je koncentracija virusa v likvorju pogosto prenizka (Harvala in Simmonds, 2009; Harvala in sod., 2009).

Na standardnih celičnih kulturah za osamitev EV lahko gojijo tudi nekatere genotipe HPeV. Kanadski raziskovalci so na celični kulturi HT-29 po enotedenski inkubaciji opazili, da so celice HPeV-1 velike z običajno ovalno obliko, celice EV pa manjše in nepravilnih oblik (Abed in Boivin, 2006).

2.10.2 Molekularne metode

Novejša metoda za dokazovanje okužb s HPeV, EV in hRV je metoda RT-PCR v realnem času. Je hitra, specifična in občutljiva metoda. Primerna je za nadaljnje genetske analize ter uporabna za neposredno dokazovanje virusov iz različnih kužnin. Za vsak virus so potrebni specifični začetni oligonukleotidi in primerna sonda, ki omogočajo pomnoževanje ohranjenega dela genoma 5' UTR (Harvala in sod., 2009). Le to omogoča enako občutljivost dokazovanja vseh znanih genotipov. Pri pikornavirusih je to težko doseči, zaradi velike variabilnosti nukleotidnega zaporedja ter prekrivanja ohranjenih delov genoma med določenimi genotipi EV in hRV. Za dokazovanje okužb se uporablja tudi metoda ugnezdene RT-PCR (angl. *nested RT-PCR*), ki je primerna za neposredno tipiziranje virusa iz različnih kužnin (Nix in sod., 2010).

2.10.3 Tipiziranje

Določanje genotipa virusov je pomembno pri epidemioloških študijah (spremljanje kroženja različnih genotipov med populacijo v določenem časovnem obdobju in izbranem okolju) in pri zdravljenju ter ustrezni oskrbi bolnika (Harvala in Simmonds, 2009).

Tradicionalna metoda tipiziranja je določanje virusnih antigenov z nevtralizacijskimi protitelesi in z uporabo standardnih anti-serumov. S to metodo so določili HPeV serotipa 1 in 2. Za določevanje preostalih genotipov pa ni na voljo standardnih antiserumov, zato je

učinkovitejša metoda molekularno tipiziranje dela gena VP3/VP1, s katero so določili preostale genotipe HPeV (Harvala in sod., 2008).

Neposredno genotipiziranje iz pomnoženih delov ohranjenega dela genoma 5' UTR ni primerno, zaradi visoke stopnje rekombinacije med 5' UTR in VP1 področjem genoma (Benschop in sod., 2010). Primernejše področje je VP1, ki omogoča tipiziranje različnih genotipov HPeV (Harvala in sod., 2010). Prav tako so to področje uporabljali pri serotipizaciji z nevtralizacijskimi protitelesi (Benschop in sod., 2010). Pomanjkljivost področja VP1 je manjša občutljivost neposrednega pomnoževanja in tipiziranja, zaradi visoke variabilnosti (Harvala in Simmonds, 2009). Za določitev genotipov HPeV raziskovalci predlagajo primernejšo metodo, in sicer ugnezdeno RT-PCR, s katero pomnožijo področje med VP3 in VP1 ter nato neposredno določijo genotip. Metoda je občutljiva in omogoča tipiziranje iz vseh vrst kužnin (Harvala in sod., 2008).

2.10.4 Druge diagnostične metode

Kot alternativa za dokazovanja HPeV, se uporabljajo serološke metode za dokazovanje protiteles IgM in IgG. Uporabne so v primerih, ko je oseba bolna in virusa z molekularnimi tehnikami ne morejo dokazati, ker je preteklo preveč časa od primarne okužbe. Uporablja se tudi diagnostična metoda ELISA, pri kateri uporabljajo sintetične peptide kapsidnih proteinov ($VP0^{60}$ in$VP3^{87}$). Pomanjkljivost seroloških metod je, da ne morejo dokazati vseh serotipov (Harvala in Simmonds, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

V Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani izvajajo rutinsko testiranje na virusne povzročitelje okužb dihal in rutinsko serološko testiranje proti virusom patogenim za osrednje živčevje. Za namen diplomske naloge smo izbrali 118 vzorcev dihal in likvorjev. Vzorce dihal smo namenoma izbrali tako, da so v večini pripadali otrokom do prvega leta starosti in so bili poslani z oddelkov, kjer smo pričakovali težak potek bolezni (intenzivna enota). Vzorci, ki so ustrezali tem kriterijem so bili poslani v laboratorij med 20.2.2007 in 15.1.2010.

Od skupno 118 vključenih vzorcev je bilo 96 (81,4 %) vzorcev dihal, ki so bili negativni z metodo neposredne imunofluorescence na prisotnost antigenov adenovirusov, človeškega metapnevmovirusa, respiratornega sincicijskega virusa, virusov influence A in B ter virusov parainfluence 1, 2, in 3.
Med vzorci dihal je bilo največ aspiratov traheje (AT), in sicer 75 vzorcev. Preostale kužnine dihal so bile brisi nosnega dela žrela (12 vzorcev), bronhoalveolarni izpirki (BAL) (6 vzorcev) in brisi žrela (3 vzorci).

V raziskavo smo vključili tudi 22 (18,6 %) likvorjev, v katerih predhodno niso odkrili protiteles proti virusom patogenim za osrednje živčevje (virus klopnega meningoencefalitisa, virus mumpsa, herpes simpleks virus 1 in 2, enterovirus, poliovirus ter virus varičele-zostra).
Vsi vzorci so bili shranjeni pri temperaturi -20 ^{o}C.

3.1.2 Preiskovanci

Od skupno 118 kliničnih vzorcev je bilo 61 (51,7 %) vzorcev dečkov in 57 (48,3%) vzorcev deklic. Preiskovance smo razdelili v tri starostne skupine, in sicer v starostno

skupino od 0 do 12 mesecev (vključenih 72 vzorcev), starostno skupino od 13 do 36 mesecev (vključenih 24 vzorcev) in v starostno skupino od 37 do 63 mesecev (vključenih 22 vzorcev). Povprečna starost otrok je bila 16,1 mesecev (mediana starosti 7,7 mesecev), najmlajši preiskovanec je bil star en dan, najstarejši pa šest let.

3.2 METODE DELA

Vse vzorce smo z RT-PCR v realnem času pregledali na prisotnost HPeV oz. pikornavirusov (vključno s hRV in EV). HPeV smo določili nukleotidno zaporedje, da bi ugotovili kateri genotipi so razširjeni med otroci v Sloveniji. Občutljivost metode RT-PCR v realnem času smo preverili s komercialnim kompletom reagentov (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija).

3.2.1 Osamitev celokupne nukleinske kisline

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

- kartuše z reagenti (proteinaza K, litični pufer, magnetni delci, spiralni pufer ter elucijski pufer),
- nastavke za pipete,
- epruvete za vzorce,
- elucijske epruvete,
- pokrovčke za elucijske epruvete.

Brezprašno komoro (LFV 91T, Iskra Pio) smo vsaj za pol ure pred začetkom dela izpostavili UV svetlobi. Nato smo kovinsko površino obrisali s 70 % etanolom, plastične površine in pipete pa s 5 % natrijevim hipokloridom in RNAseZAP (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, ZDA). Slednjo smo uporabili za uničevanje RNAz, ki razgrajujejo RNA in so lahko vzrok neuspešne osamitve nukleinske kisline. S temi postopki smo si zagotovili nekontaminiran delovni prostor.

Vzorce smo odmrznili in jih dobro premešali na mešalniku, da so se celice v tekočini enakomerno porazdelile. V 1,5 ml epruvetke smo pipetirali interni kontroli (angl. *internal control*, IC), in sicer 0,5 µl EAV (angl. *equine arteritis virus*) in 0,5 µl EHV1 (angl. *equine herpesvirus type 1*) za kontrolo uspešne osamitve ter dodali 190 µl vzorca. V aparaturo MagNA Pure Compact (Roche, Applied Science, Basel, Švica) za osamitve nukleinske kisline smo vstavili kartuše, ki smo jih dodobra pretresli, da so se magnetni delci odlepili od stene in ustrezno porazdelili v tekočini. Na ustrezna mesta smo postavili vzorce ter elucijske epruvetke, v katerih je po končani osamitvi eluirana nukleinska kislina. Na aparatu smo izbrali protokol »DNA blood«, volumen vzorca 200 µl in elucijski volumen 100 µl. Po končanem postopku smo elucijske epruvetke zaprli z zamaškom, zapisali ustrezno številko na pokrovček, ter shranili pri -20 ^{o}C.

Za osamitev HPeV smo ponovno izbrali sedem vzorcev in jih osamili po protokolu, ki ga predlaga komercialni proizvajalec (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija). V 1,5 ml epruvetke smo ločeno odpipetirali 200 µl vzorca in 10 µl IC (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija) ter izbrali protokol »Total_NA_plasma_100_400«, volumen vzorca 200 µl, elucijski volumen 100 µl ter IC 10 µl.

Med delom smo večkrat menjali rokavice in upoštevali tehnike varnega dela ter bili pazljivi, da ni prišlo do kontaminacije vzorcev z vzorci. Za pipete smo uporabili sterilne epruvetke in sterilne nastavke s filtri.

3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo in reverzno transkriptazo

3.2.2.1 Teoretične osnove

Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) je v zadnjem obdobju postala zlati standard za dokazovanje številnih virusov, zlasti zaradi hitrosti metode in možnosti kvantifikacije. Iz specifičnega dela genoma, ki ga želimo pomnožiti, dobimo več kopij želenega odseka genoma. Metoda temelji na pomnoževanju ohranjenega dela nukleotidnega zaporedja s pomočjo kratkih začetnih oligonukleotidov, ki se pripnejo na tarčno zaporedje. Delujejo kot substrat za termostabilen encim polimerazo DNA, ki

omogoča nastanek komplementarnega zaporedja z dodajanjem deoksinukleotidov. Pogosto se uporablja polimeraza *Taq* iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (Mackay in sod., 2002).

Nadgradnja klasičnega PCR je PCR v realnem času, ki omogoča merjenje pridelkov ob vsakem ciklu pomnoževanja. Prednost te metode je, da ni potrebno dokazovati pridelkov z gelsko elektroforezo oz. z drugimi analiznimi metodami, kar zmanjša možnost kontaminacije. Metoda je hitrejša in občutljivejša (Invitrogen, 2008).

Metoda PCR je osnovana tako, da pomnožuje le molekule DNA, za pomnoževanje molekul RNA pa je potreben dodaten encim. Taka različica metode je RT-PCR. Encim reverzna transkriptaza prepiše RNA v komplementarno DNA (cDNA), nakar sledi pomnoževanje želenega odseka genoma. Če reverzni prepis in pomnoževanje gena poteka v eni sami zaprti reakciji, metodo imenujemo enostopenjski RT-PCR, če pa poteka reakcija ločeno gre za dvostopenjski RT-PCR. Prednost enostopenjske reakcije je zmanjšana možnost kontaminacije in drugih napak, ki se pojavi med samim delom ter cenejša in hitrejša izvedba same reakcije (Invitrogen, 2008).

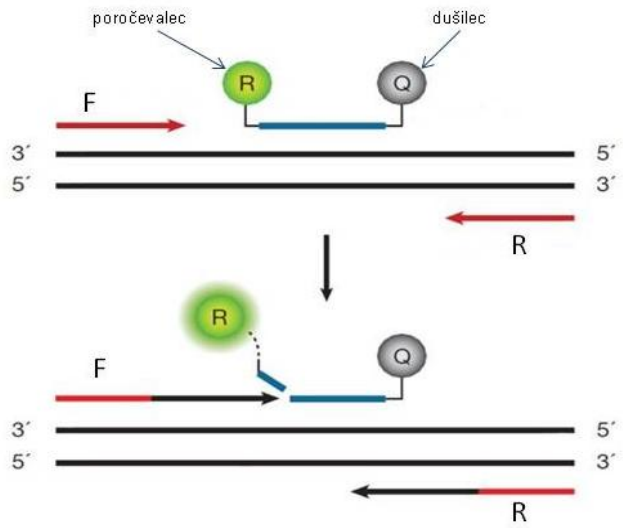
Metoda RT-PCR v realnem času je zastavljena tako, da pri temperaturi 42-55 ^{o}C encim reverzna transkriptaza prepiše virusno RNA v cDNA in nastane dvovijačni hibrid RNA-cDNA. Slednjega razgradi reverzna transkriptaza, ki se v naslednji stopnji pri temperaturi 95 ^{o}C inaktivira. Aktivira se polimeraza DNA, ki prepiše cDNA v dvojnovijačno cDNA. Temu sledi reakcija PCR, ki je sestavljena iz treh stopenj:

- **denaturacija** pri temperaturi 90-95 ^{o}C, dvovijačna DNA se razklene v dve enovijačni molekuli,
- **prileganje** začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50-60 ^{o}C (temperatura je odvisna od nukleotidnega zaporedja začetnih oligonukleotidov in sonde),
- **podaljševanje** DNA verige pri 72 ^{o}C, kjer polimeraza DNA v smeri od 5' proti 3' koncu sintetizira komplementarno verigo.

Stopnje predstavljajo en temperaturni cikel PCR, ki se ponovi od 25 do 40 krat, število kopij tarčnega zaporedja pa z vsakim ciklom eksponentno narašča. Sprotno sledenje

količine nastalih pridelkov nam omogočajo z barvili označene sonde s specifičnim zaporedjem (Invitrogen, 2008).

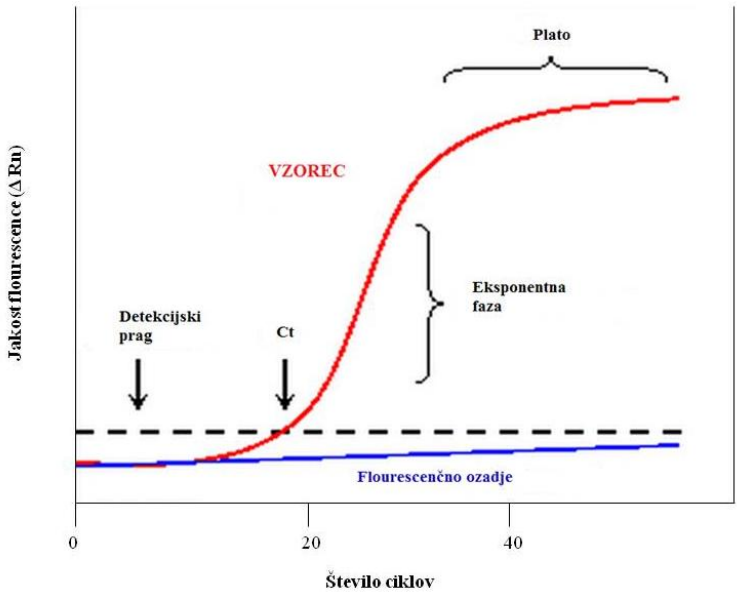
Najpogosteje se uporablja hidrolizirajoča sonda *TaqMan*, ki ima na 5' konec vezano fluorescenčno barvilo ali t.i. poročevalec, na 3' konec pa dušilec, ki je lahko fluorescirajoč ali nefluorescirajoč. Sonda se veže na komplementarno verigo DNA med oba začetna oligonukleotida, nakar polimeraza *Taq* med podaljševanjem verige s 5'-3' eksonukleazno aktivnostjo cepi vezano sondo. Tako poročevalec in dušilec nista več povezana in prekine se prestrezanje flourescence s strani dušilca. Intenziteta nastale fluorescence je sorazmerna s količino pridelka PCR (Invitrogen, 2008).



Slika 5: Shematski prikaz delovanja hidrolizirajoče sonde TaqMan (Invitrogen, 2008: 15). F – pozitivno usmerjeni začetni oligonukleotidi, R – negativno usmerjeni začetni oligonukleotidi.

Naraščanje jakosti fluorescence spremljamo z računalniškim programom, ki nam izriše krivuljo fluorescence posameznih vzorcev v odvisnosti od števila ciklov reakcije PCR. Krivuljo lahko razdelimo na štiri faze. V prvi fazi fluorescence pridelka PCR ne ločimo od fluorescence ozadja, ker je jakost signala pod detekcijskim pragom merilne naprave. Ko signal preseže detekcijski prag, začne eksponentno naraščati. Točka v kateri krivulja seka detekcijski prag označimo s C_t (angl. *threshold cycle*). Vrednosti C_t nakazujejo količino pridelka PCR in so obratno sorazmerne z začetno vrednostjo tarčne DNA. Ker je sama

reakcija omejena s količino reagentov, se pomnoževanje tarčnega zaporedja upočasni, fluorescenca ne narašča več in sledi zadnja faza, ki jo imenujemo plato (Mackay in sod., 2002).



Slika 6: Krivulja jakosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov reakcije PCR (Real-Time…, 2011)

Tarčni gen za pomnoževanje HPeV, hRV in EV je genski predel 5' nekodirajoče regije, ki je visoko ohranjen med pikornavirusi. Podatki o začetnih oligonukleotidih in oligonukleotidnih sondah so prikazani v preglednici 1. Oligonukleotidne sonde so na 5' koncu označene z reporterskim fluorogenom FAM™ (karboksi-flurescein), na 3' koncu pa z zaviralnim fluorogenom TAMRA™ (karboksi tetrametil-rodamin) ali BHQ™ (angl. *Black hole quencher*). Za dokazovanje EV smo uporabili komercialno dostopen komplet reagentov (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija). HPeV pa smo pomnoževali:

- z RT-PCR v realnem času, kjer smo sami izbrali ustrezne reagente in pogoje pomnoževanja (HPeV-F, HPeV-R, HPeV-Pr),
- s klasičnim RT-PCR (AN345, AN344),
- s komercialnim kompletom reagentov (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija).

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi in oligonukleotidne sonde uporabljene pri pomnoževanju tarčnih odsekov izbranih virusov. F – pozitivno usmerjeni začetni oligonukleotidi (angl. *forward primer*), P – sonda (angl. *proba*), R – negativno usmerjeni začetni oligonukleotidi (angl. *reverse primer*), HPeV – človeški parehovirusi, hRV – človeški rinovirusi, FAM - reporterskim fluorogenom (karboksi-flurescein), TAMRA - zaviralnim fluorogenom (karboksi tetrametil-rodamin), BHQ - zaviralnim fluorogenom (angl. *Black hole quencher*).

Oznaka oligonukleotidnega zaporedja	Oligonukleotidno zaporedje	Mesto prileganja	Tarčni gen	Dolžina tarčnega odseka	Vir
HPeV-F	F: 5'- CAC TAG TTG TAA GGC CCA CG-3'	538-557	5' nekodirajoča regija	78	Noordhoek in sod., 2007
HPeV-R	R: 3'-GGC CCC AGA TCA GAT CC-5'	600-616			
HPeV-Pr	P: 5'-FAM—AGA AGG TAC CCG CAG GTA ACA AGA GAC—TAMRA-3'	568-594			
AN345	F: 5'-GTA ACA SWW GCC TCT GGG SCC AAA AG-3'	421-446	5' nekodirajoča regija	194	Nix in sod., 2008
AN344	R: 3'-GGC CCC WGR TCA GAT CCA YAG T-5'	615-594			
235 HRV 1s	F: 5'-GAC ARG GTG TGA AGS YS-3'	409-425	5' nekodirajoča regija	142	Scheltinga in sod., 2004
235 HRV 2s	F: 5'-GAC ATG GTG TGA AGA CYC-3'	409-426			
236 HRV as	R: 3'-CAA AGT AGT YGG TCC CAT CC-5'	532-551			
522 HRV-TQ-FAM	P: FAM—TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG CTA A—BHQ-1	451-470			

3.2.2.2 Pomnoževanje tarčnega odseka HPeV in hRV z RT-PCR v realnem času

Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili komercialni komplet SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen™, Grand Island, New York, ZDA), ki vsebuje $MgSO_4$, barvilo ROX, encimsko mešanico in 2X RT-PCR pufer. Reakcijsko mešanico smo pripravili v brezprašni komori, ki je izključno namenjena za to delo. V 1,5 ml epruvetko smo odpipetirali ustrezne količine reagentov za vsak virus (preglednica 2).

Preglednica 2: Reakcijska mešanica za RT-PCR v realnem času za človeški parehovirus in človeški rinovirus. HPeV – človeški parehovirus, hRV – človeški rinovirus.

HPeV	hRV
0,75 µl začetnega oligonukleotida HPeV-F (20 µM)	0,16 µl začetnega oligonukleotida 235 hRV 1s (50 µM)
0,75 µl začetnega oligonukleotida HPeV-R (20 µM)	0,16 µl začetnega oligonukleotida 235 hRV 2s (50 µM)
	0,16 µl začetnega oligonukleotida 236 hRV as (50 µM)
0,50 µl oligonukleotidne sonde HPeV-P (20 µM)	0,136 µl oligonukleotidne sonde 522 hRV-TQ-FAM (50 µM)
12,5 µl 2x RT-PCR pufra	10 µl 2x RT-PCR pufra
1 µl $MgSO_4$ (5 mM)	0,6 µl $MgSO_4$ (5 mM)
0,5 µl RT-PCR encimske mešanice	0,4 µl RT-PCR encimske mešanice
0,5 µl ROX barvilo	0,4 µl ROX barvilo
3,5 µl vode, proste nukleaz	2,984 µl vode, proste nukleaz

Reagenčno ploščico smo postavili na ohlajeno stojalo ter odpipetirali 20 µl reakcijske mešanice za HPeV in 15 µl za hRV. V drugi brezprašni komori pa smo v reagenčno ploščico dodali 5 µl ustrezne RNA. Za dokaz hRV smo kot pozitivno kontrolo uporabili pozitiven vzorec iz rutinske diagnostike. Pozitivne kontrole za HPeV nismo uporabili, ker smo virus v laboratoriju prvič pomnoževali. Za negativno kontrolo smo uporabili demineralizirano destilirano vodo (ddH_2O) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA). Reagenčno ploščico smo pokrili s folijo, jo centrifugirali za kratek čas, da smo

zbrali vso tekočino na dno vdolbinic in dali v aparat StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA). Postopek smo izvedli za vsak virus posebej in se s tem izognili možnim navzkrižnim kontaminacijam.

S pomočjo programske opreme StepOne™ (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA) smo pripravili protokol in vnesli ustrezne pogoje za pomnoževanje nukleinske kisline (preglednica 3). Potek reakcije smo lahko spremljali preko računalnika. Po končani reakciji smo odčitali ter analizirali rezultate.

Za dokazovanje prisotnosti HPeV v vzorcih bolnikov smo uvedli novo molekularno metodo RT-PCR v realnem času. Uporabili smo znane začetne oligonukleotide in sondo (Noordhoek in sod., 2008) ter njihovo koncentracijo prilagodili.

3.2.2.3 Pomnoževanje tarčnega odseka HPeV s komercialnim kompletom

Podjetje Argene® (Biomérieux, Verniolle, Francija) je pred kratkim razvilo komercialno dostopen kit za dokazovanje HPeV, in sicer Parechovirus R-gene™ (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija). Da bi preverili natančnost našega RT-PCR, smo izbrane vzorce še dodatno testirali z omenjenim kitom. Slednji vsebuje:

- interno kontrolo,
- reakcijsko mešanico (dNTP-ji, $MgCl_2$, pufer, začetni oligonukleotidi in sonde, IC, Taq polimerazo, barvilo ROX™),
- reverzno transkriptazo,
- pozitivno kontrolo.

Reverzno transkriptazo smo redčili v razmerju 1:10 in za en vzorec v 1,5 ml epruvetko odpipetirali 0,15 µl reverzne transkriptaze ter 15 µl reakcijske mešanice. Za posamično reakcijo smo na reagenčno ploščico odpipetirali 10 µl RNA in 15 µl reakcijske mešanice. RT-PCR v realnem času je potekala v aparaturi Light cycler 480 II (Roche, Applied Science, Mannheim, Nemčija).

3.2.2.4 Pomnoževanje tarčnega odseka EV z RT-PCR v realnem času

Uporabili smo komercialni komplet Enterovirus R-gene™ (Argene®, Biomérieux, Verniolle, Francija), ki vsebuje:

- reakcijsko mešanico (začetni oligonukleotidi, sonde, IC, dNTP-ji, pufer, Taq polimerazo),
- reverzno transkriptazo Omniscript™,
- pozitivno kontrolo.

Za en vzorec smo v 1,5 ml epruvetko odpipetirali 15 µl reakcijske mešanice in 0,1 µl reverzne transkriptaze. Za posamično reakcijo smo na reagenčno ploščico odpipetirali 10 µl RNA in 15 µl reakcijske mešanice.

Pomnoževanje RNA EV smo izvedli s sistemom Light cycler 480 II (Roche, Applied Science, Mannheim, Nemčija). Protokol pomnoževanja nukleinske kisline je prikazan v preglednici 3.

Komercialni komplet omogoča dokazovanje nukleinskih kislin EV na delu gena 5' UTR iz različnih vzorcev. S komercialnim kompletom pa lahko dokažemo tudi nekatere serotipe hRV (serotip B14, B17, A22), ne moremo pa pomnožiti RNA HPeV genotipov 1, 2 in 3.

Preglednica 3: Prikaz stopenj reakcije RT-PCR v realnem času za pikornaviruse. HPeV – človeški parehovirusi, hRV – človeški rinovirusi, EV – enterovirusi

Proces	HPeV			hRV			EV		
	Čas	Temperatura	Število ciklov	Čas	Temperatura	Število ciklov	Čas	Temperatura	Število ciklov
Reverzna transkripcija	30 minut	50 °C	1	20 minut	50 °C	1	30 minut	50 °C	1
Prekinitev delovanja reverzne transkriptaze in aktivacija Taq DNA-polimeraze	10 minut	95 °C	1	2 minuti	95 °C	1	15 minut	95 °C	1
Denaturacija dvovijačne cDNA	15 sekund	95 °C	45	15 sekund	95 °C	45	10 sekund	95 °C	45
Prileganje začetnih oligonukleotidov	30 sekund	58 °C		45 sekund	60 °C		40 sekund	60 °C	
Podaljševanje verige	10 sekund	72 °C					25 sekund	72 °C	

3.2.2.5 Pomnoževanje tarčnega odseka HPeV s klasičnim RT-PCR

Z aparaturo Eppendorf Mastercycler® gradientS (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) smo pomnožili želen odsek HPeV in dokazali prideleke RT-PCR reakcije z agarozno gelsko elektroforezo. Na ta način smo lahko določili nukleotidno zaporedje želenega odseka.

Za reakcijo RT-PCR smo v 1,5 ml epruvetko pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala:

- 0,6 µl začetnega oligonukleotida AN345 (50 µM),
- 0,6 µl začetnega oligonukleotida AN344 (50 µM),
- 10 µl 5X RT-PCR pufer,
- 2 µl dNTP,
- 2 µl RT-PCR encimske mešanice,
- 29,8 µl vode proste nukleaz.

V 150 µl epruvetko smo odpipetirali 45 µl reakcijske mešanice ter dodali 5 µl RNA, ki smo jo dokazali z metodo RT-PCR v realnem času. Kot negativno kontrolo smo uporabili ddH_2O.

Prepis RNA v komplementarno verigo DNA (cDNA) je potekal 30 minut pri 50 ^oC, nakar je sledilo zvišanje temperature na 94 ^oC za 15 minut. S tem smo inaktivirali reverzno transkriptazo ter aktivirali Taq DNA polimerazo. Sledilo je 40 ciklov pomnoževanja v sledečem zaporedju:

- denaturacija dvovijačne cDNA (30 sekund pri 94 ^oC),
- prileganje začetnih oligonukleotidov (30 sekund pri 68 ^oC),
- podaljševanje DNA verige (1 minuta pri 72 ^oC).

Na koncu je sledila še 10 minutna inkubacija pri 72 ^oC in nato ohlajanje reakcijske mešanice na 4 ^oC.

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Za pripravo 2 % agaroznega gela smo v erlenmajerico natehtali 1 g agaroze (NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, ZDA) in dodali 50 ml 1x pufra TAE (tris/acetat/EDTA). Vse skupaj smo segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agaroza raztopila. Še tekočemu gelu smo dodal 8 µl etidijevega bromida (koncentracija 10 mg/ml) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA), ki se vrine med dvojno vijačnico in pod UV svetlobo zasveti. Pri delu s fluorescentnim barvilom smo bili previdni, ker je mutagen. Gel smo zlili v kadičko za elektroforezo z vstavljenimi glavnički in počakali, da se strdi. Nato smo gel zalili z 1X TAE ter odstranili glavničke. Na mikrotitrski ploščici smo pripravili 12 µl mešanico iz 10 µl pridelka PCR ter 2 µl nosilne raztopine *Loading Dye Solution* (brom-fenol modro, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija). V vdolbinice na gelu smo nanesli mešanico ter 4 µl molekularnega označevalca 100 bp DNA Ladder (GeneRuler, Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija). Elektroforeza je tekla 30 minut pri napetosti 75 V. Negativno nabita nukleinska kislina je potovala v smeri od negativne elektrode (katoda) proti pozitivni elektrodi (anodi) zaradi ustvarjenega električnega polja. Po končani elektroforezi smo gel pogledali v aparaturi za dokumentacijo gelov (Nuffield Road, Cambridge, Anglija) in ga fotografirali.

3.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

3.2.4.1 Teoretične osnove

Tako za epidemiološke raziskave kot tudi za klinično diagnostiko je pomembno poznavanje različnih in odkrivanje novih tipov virusov. V ta namen uporabljamo molekularno metodo sekveniranja, s katero lahko natančno določimo nukleotidno zaporedje genoma. Uporabili smo Sangerjevo oziroma terminacijsko metodo, ki je danes popolnoma avtomatizirana in temelji na fluorescentno označenih dideoksinukleotidtrifosfatih (ddNTP), ki se dodajajo na rastočo DNA verigo. Terminatorji ddNTP-ji imajo na 3' koncu vezan vodik, namesto –OH skupine, zato polimeraza DNA ne more dodati naslednjega nukleotida in pride do prekinitve podaljševanja verige. Nastali,

različno dolgi odseki DNA, se ločijo s kapilarno gelsko elektroforezo. Laserski čitalec zazna znane flourescentne spektre na posameznih ddNTP-jih. Rezultate analiziramo z ustrezno programsko opremo.

3.2.4.2 Čiščenje pridelkov PCR

Pridelke, ki smo jih dobili na gelski elektroforezi, je smo predhodno očistili, da smo se znebili ostankov začetnih oligonukleotidov, deoksinukleotidov (dNTP) ter ostankov polimeraze Taq. Uporabili smo komplet reagentov WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA). Metoda temelji na vezavi nukleinske kisline na silika membrano posebne kolone s kaotropnimi soli.

Sterilni 1,5 ml epruvetki s 40 µl pridelka PCR smo dodali 40 µl raztopine *Membrane Binding Solution*, ki omogoča vezavo pridelkov PCR na membrano. Tako pripravljeno mešanico smo prenesli v zbiralno epruvetko z membrano ter inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Sledilo je minutno centrifugiranje pri 14000 obratih/minuto. Odlili smo vso tekočino, dodali 700 µl *Membrane Wash Solution,* ki spira nečistoče iz pridelka PCR ter centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Ponovno smo odlili vso tekočino ter še enkrat dodali 500 µl *Membrane Wash Solution* in centifugirali 5 minut pri 14000 obratih/minuto. Nato smo izpraznili zbiralno epruvetko in centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih/minuto. Membrano smo prenesli v sterilno epruvetko in dodali 50 µl vode proste nukleaz. Sledila je minutna inkubacija pri sobni temperaturi nato minutno centrifugiranje pri 14000 obratih/minuto. S tem smo sprali produkte PCR z membrane, jo zavrgli, očiščene pridelke PCR pa shranili pri 4 ^{o}C.

3.2.4.3 Določanje koncentracije očiščenih pridelkov PCR

Med čiščenjem se določen odstotek pridelka PCR izgubi. Zato smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili uspešnost čiščenja in semikvantitativno ocenili koncentracijo nukleinske kisline. Na 1,6 % agarozni gel smo nanesli 3 µl očiščenega pridelka PCR, 2 µl

nosilne raztopine in 7 µl deionizirane vode. Po končani elektroforezi smo pogledali gel pod UV lučjo in ocenili jakost fragmenta od 1 (najmočnejša jakost) do 5 (najšibkejša jakost).

3.2.4.4 Sekvenčna reakcija

Določanje nukleotidnega zaporedja je potekalo popolnoma avtomatizirano v aparaturi Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA) s komercialno dostopnim kompletom reagentov BigDye® terminator cycler sequencing ready reaction kit (ABI Prism, PE Applied Biosystem, Foster City, Kalifornija, ZDA). Ti reagenti nam dovoljujejo uporabo poljubnih začetnih oligonukleotidov znotraj pomnoženega zaporedja. Uporabili smo enake začetne oligonukleotide kot pri klasičnem RT-PCR za dokazovanje HPeV (AN345 in AN344). Z obema začetnima oligonukletidoma smo izvedli sekvenčno reakcijo ločeno v dveh sterilnih epruvetkah. Na ta način smo določili nukleotidno zaporedje vsake od verig dvojne vijačnice.

Očiščen fragment je pod UV svetlobo svetil šibko (ocena 5), zato smo uporabili maksimalno dovoljeno količino nukleinske kisline. Pripravili smo 20 µl reakcijsko mešanico, ki je vsebovala:

- 5 µl DNA,
- 1,3 µl začetnega oligonukleotida (50 µM),
- 3 µl reakcijskega pufra,
- 2 µl sekvenčne mešanice (polimeraza DNA FS-različica polimeraze DNA Taq, dNTP, ddNTP),
- 8,7 µl vode.

Sekvenčna reakcija je potekla v 25-ih ciklih:

- denaturacija DNA (10 sekund pri 96 ^{o}C),
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov (5 sekund pri 50 ^{o}C),
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov (4 minute pri 60 ^{o}C).

Sledilo je ohlajanje reakcijske mešanice na 4 ^{o}C.

3.2.4.5 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

Komercialni komplet DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) je enostavna in hitra metoda čiščenja pridelkov PCR, ki temelji na vezavi DNA na gel v kolumni. Z uporabo tega kompleta reagentov smo očistili pridelka sekvenčne reakcije in se s tem znebili nevključenih dNTP-jev, začetnih oligonukleotidov in polimeraze FS.

Uporabili smo dve kolumni z gelom, za vsako sekvenčno reakcijo posebej. Kolumni smo premešali na vibracijskem mešalu, odvili pokrovček in odlomili spodnji del. Nato smo kolumni centrifugirali 3 minute pri 3000 obratih/minuto. Zavrgli smo uporabljeni epruvetki in kolumni prenesli v novi epruvetki. Na gel smo nanesli celotni volumen sekvenčne mešanice (20 µl). Pri tem smo bili pazljivi, da se nismo z nastavkom za pipete dotaknili gela ali stene epruvetke. Sledilo je 3 minutno centrifugiranje pri 3000 obratih/minuto. Kolumni smo zavrgli, epruvetki pa dali v ohlajeno vakuumsko centrifugo in centrifugirali 14 minut, da se je vzorec posušil. Pozorni smo bili, da vzorca nismo preveč osušili.

Za analizo sekvenčne reakcije smo potrebovali enovijačno DNA, zato smo osušena pridelka denaturirali. Najprej smo ju rehidrirali s 25 µl formaldehida in ju večkrat premešali. Rehidrirana vzorca smo prenesli v epruvetko za sekveniranje in ju za 2 minuti pri 95 ^{o}C postavili v aparaturo Primus 96 plus (MWG Biotech Inc., ZDA). Po končani reakciji smo enoverižno DNA takoj prenesli na led, da ne bi prišlo do ponovnega spajanja v dvovijačno verigo.

Pridelka smo pred sekveniranjem premešali na vibracijskem mešalu in ju dali v avtomatski sekvenator ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, ZDA), ki ločuje pomnožene odseke v kapilari s prilagojenim polimerom (POP6). Laserski čitalec zazna značilno fluorescenco barvil, ki so vezani na ddNTP-jih. S pomočjo računalniškega programa ABI PRISM^{TM} Sequencing Analysis (Applied Biosystems, Foster City, ZDA) smo dobili rezultate izpisane v obliki elektroferograma.

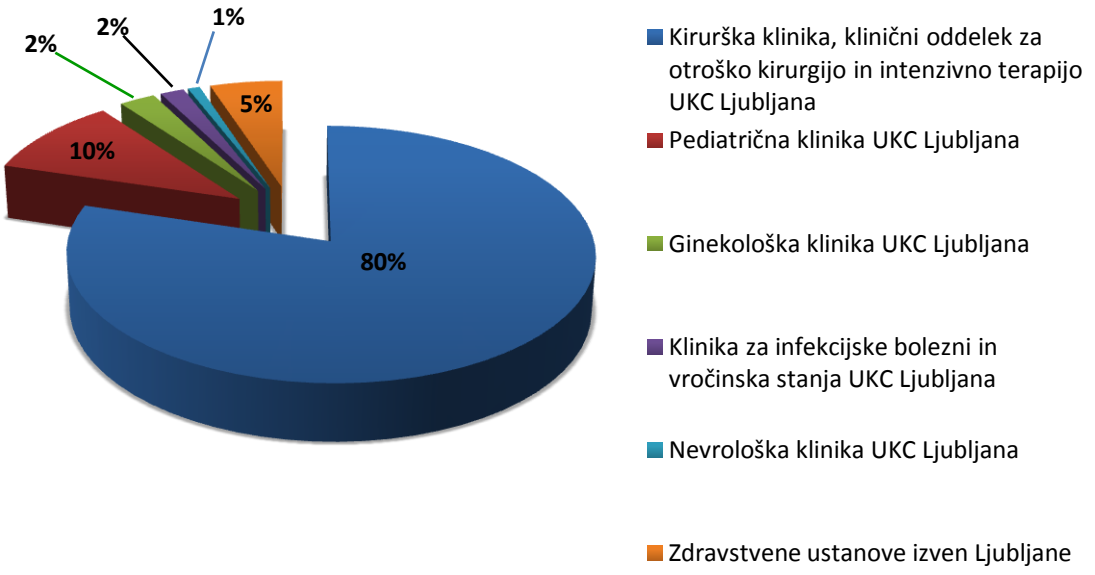
3.2.4.6 Analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja smo analizirali z računalniškim programskim paketom LaserGene 1999 (Dnastar, Madison, Winsconsin, ZDA). Ta nam omogoča sestavljanje (SeqMan), urejanje (EditSeq) in primerjanje (MegAlign) nukleotidnih zaporedij. Urejeno nukleotidno zaporedje smo primerjali v genski banki preko prosto dostopnega medmrežnega servisa BLAST (BLAST, 2011).

4 REZULTATI

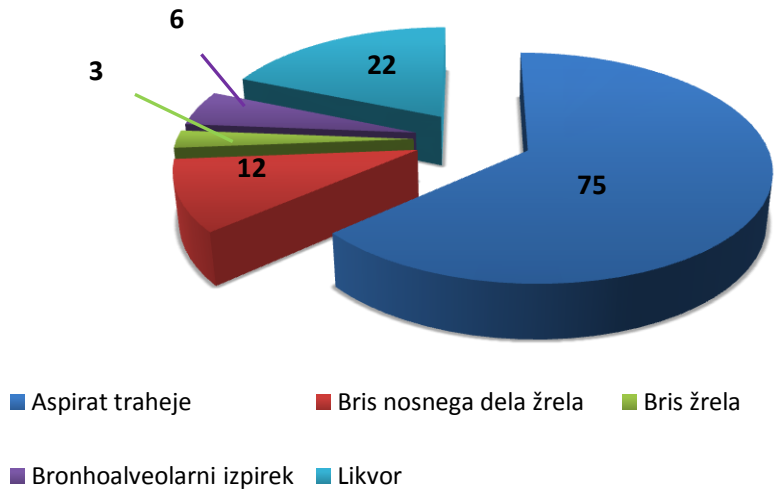
4.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili 118 vzorcev dihal in likvorjev, ki so bili v obdobju med 20.2.2007 in 15.1.2010 poslani v laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij. Večina vzorcev je bila poslanih iz Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) v Ljubljani (Kirurška klinika, klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo UKC Ljubljana, in sicer 80 %, Pediatrična klinika UKC Ljubljana 10 % ter 5 % iz drugih klinik UKC v Ljubljani) in iz drugih zdravstvenih ustanov (5 %) (slika 7).



Slika 7: Porazporeditev analiziranih vzorcev glede na pošiljatelje

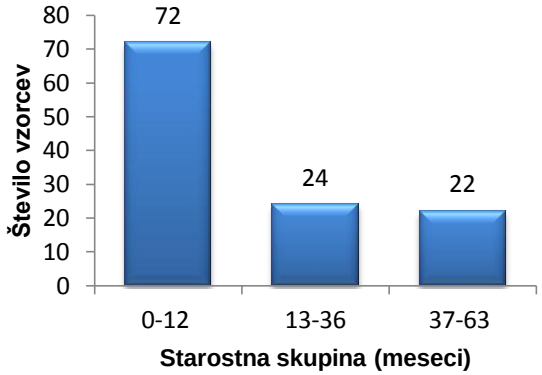
Med izbranimi kliničnimi vzorci je bila večina aspiratov traheje (64 %) in likvorjev (19 %) ter brisov nosnega dela žrela (10 %), manj je bilo bronhoalveolarnih izpirkov (5 %) in brisov žrela (3 %) (slika 8).



Slika 8: Porazdelitev analiziranih vzorcev glede na vrsto kužnine

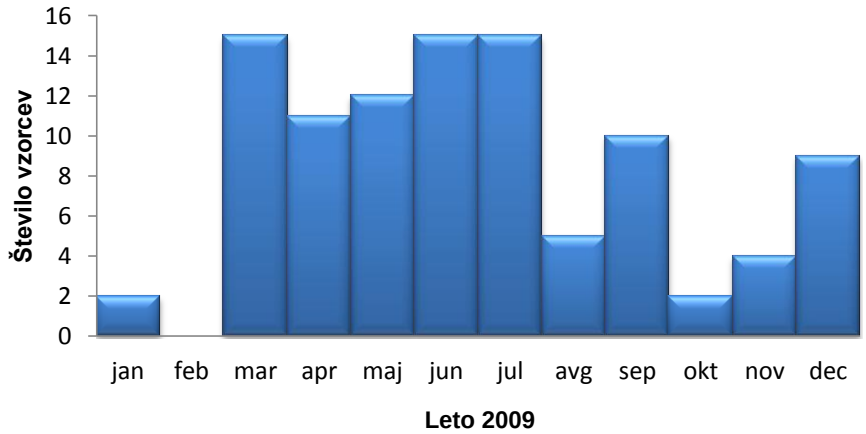
4.2 PREISKOVANCI

Vsi vzorci, ki so bili vključeni v raziskavo, so pripadali otrokom starim do šest let. Od tega je 61 (51,7 %) vzorcev pripadalo dečkom in 57 (48,3 %) vzorcev deklicam. Preiskovance smo razdelili v tri starostne skupine. Več kot polovica preiskovancev (61 %) je bila starih med 0 in 12 mesecev, 20 % otrok je bilo starih med 13 in 36 mesecev, 19 % otrok pa je bilo starih med 37 in 63 mesecev. Najmlajši preiskovanec je bil star 1 dan, najstarejši pa 6 let. Mediana starosti otrok je bila 7,7 mesecev (slika 9).



Slika 9: Porazdelitev analiziranih vzorcev v tri starostne skupine otrok

Od 118 vzorcev je bilo 100 vzorcev poslanih v laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij v letu 2009 in več kot polovica vzorcev je bilo poslanih v obdobju med marcem in julijem. (slika 10).



Slika 10: Porazdelitev analiziranih vzorcev v letu 2009

4.3 REZULTATI RT-PCR V REALNEM ČASU

Z metodo RT-PCR v realnem času smo v 29 vzorcih otrok dokazali prisotnost nukleinskih kislin pikornavirusov (preglednica 4). Prisotnost HPeV smo dokazali pri enem otroku, okužbe z EV smo dokazali pri 15 otrocih ter hRV okužbe pri 13 otrocih.

Preglednica 4: Rezultati RT-PCR v realnem času na prisotnost RNA pikornavirusov

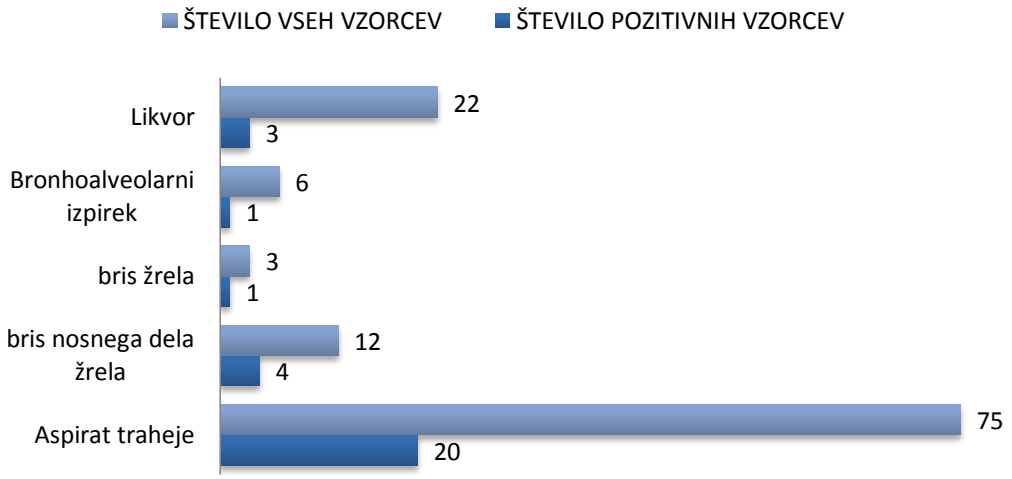
Virus	Število pozitivnih vzorcev / število vseh vzorcev (delež)	Delež pozitivnih vzorcev za posamezen virus glede na vsoto pozitivnih vzorcev
Parehovirus	1/118 (0,9 %)	3,5 %
Enterovirus	15/118 (12,7 %)	51,7 %
Rinovirus	13/118 (11,0 %)	44,8 %
Skupaj	29/118 (24,6 %)	100 %

RT-PCR v realnem času je semikvantitativna metoda, kjer je vrednost Ct obratno sorazmerna s količino virusne RNA v vzorcu. Določili smo jo pri vsakem vzorcu, v katerem se je virusna RNA pomnožila (preglednica 5).

Preglednica 5: Vrednosti Ct za reakcije PCR in mediana za posamezne reakcije

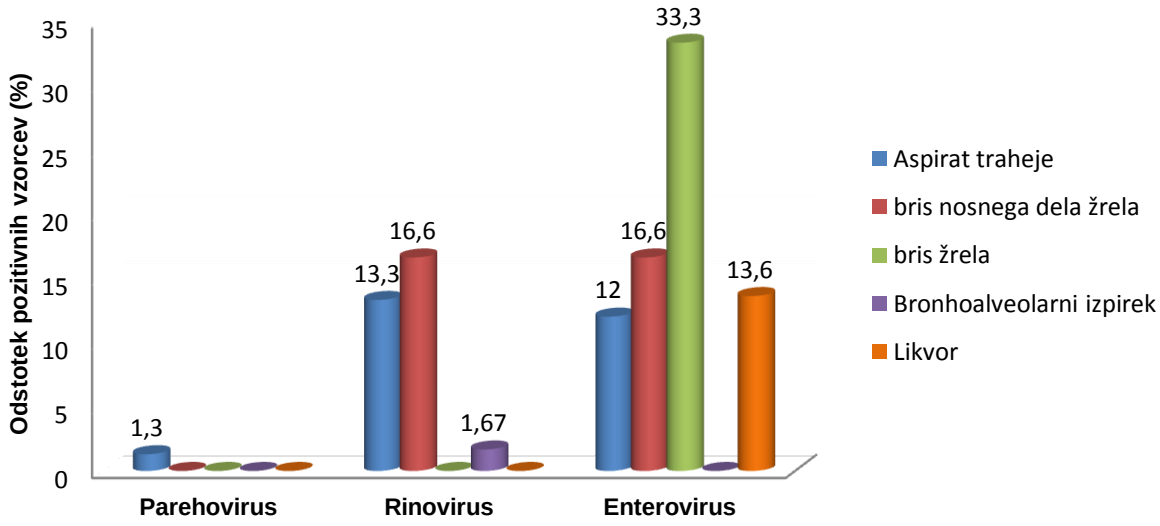
Virus	Ct (0-20)	Ct (20-30)	Ct (30-40)	Mediana
Parehovirus	0	1	0	28,4
Enterovirus	1	7	7	29,2
Rinovirus	2	6	5	28
SKUPAJ	3	14	12	

Slika 11 prikazuje število pozitivnih vzorcev glede na vrsto kužnine. RNA pikornavirusov smo pomnožili v 20 aspiratih traheje (26,7 %), v 1 bronhoalveolarnem izpirku (16,7 %) in 1 brisu žrela (33,3 %), v 3 likvorjih (13,6 %) in v 4 (33,3 %) brisih nosnega dela žrela.



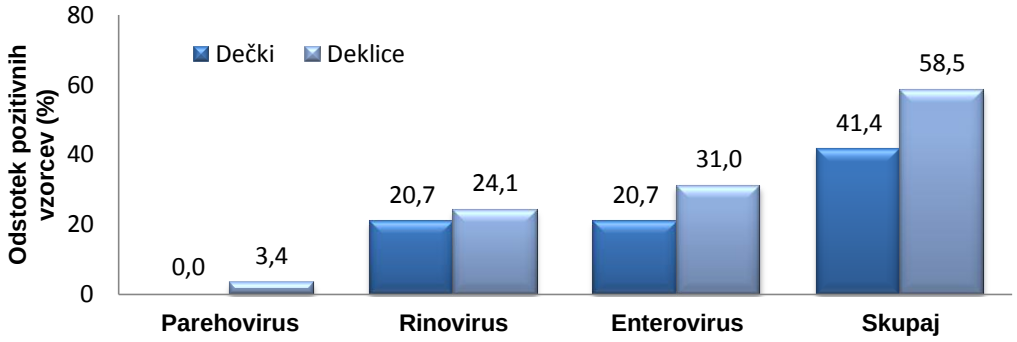
Slika 11: Število pozitivnih vzorcev glede na število vseh vzorcev za posamezno vrsto kužnine

Na sliki 12 je prikazan odstotek določenih kužnin, v katerih smo dokazali RNA pikornavirusov. RNA HPeV smo dokazali v enem aspiratu traheje. RNA EV smo dokazali v vseh kužninah z izjemo bronhoalveolarnega izpirka. RNA hRV pa smo dokazali v aspiratih traheje, v brisih nosnega dela žrela in v bronhoalveolarnih izpirkih, nikoli pa v likvorju. Delež hRV in EV je bil v brisih nosnega dela žrela enak.



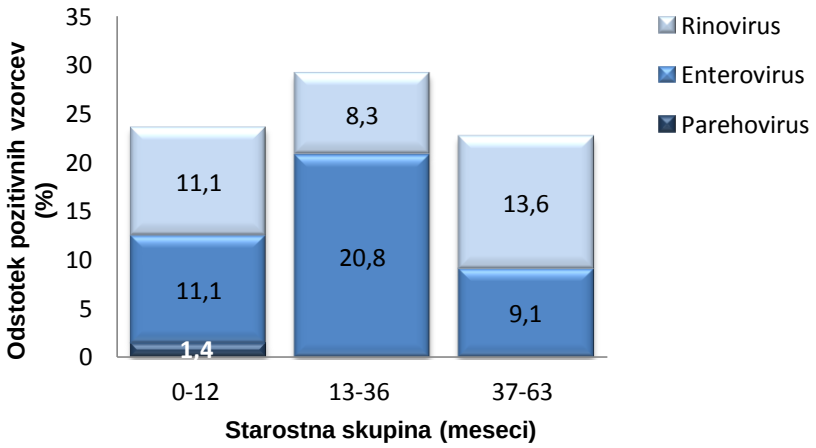
Slika 12: Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost pikornavirusov za posamezno vrsto kužnine

Med obolelimi otroci je bilo več deklic (59 %). Okužbo s HPeV smo dokazali pri eni deklici. Okužbo z EV smo pogosteje dokazali pri deklicah, pri dečkih pa smo dokazali enak delež okužb z EV in hRV (slika 13).



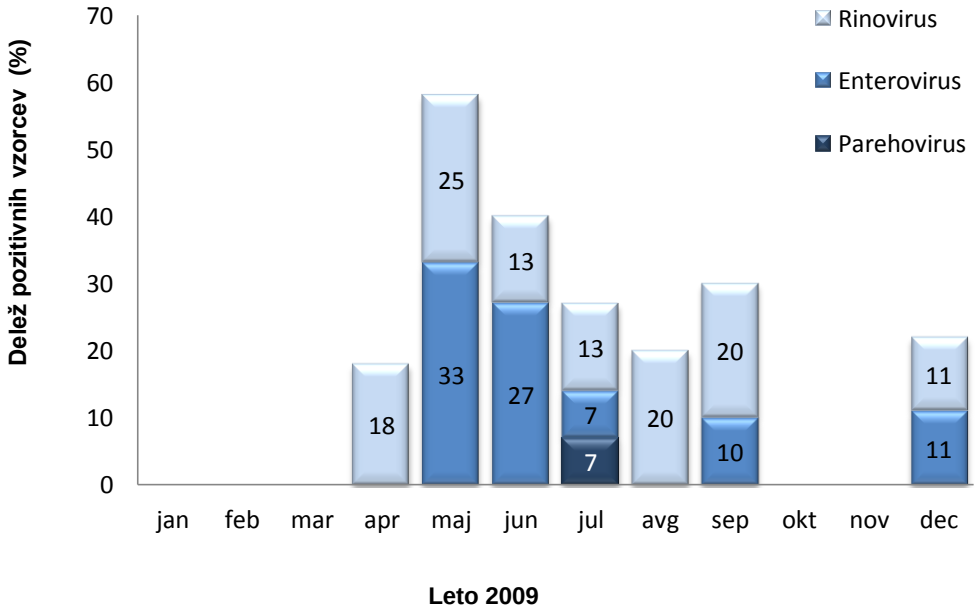
Slika 13: Odstotek dokazanih okužb s pikornavirusi pri otrocih glede na spol

Okužbo s HPeV smo dokazali pri 5 mesečni deklici. Pikornaviruse smo dokazali pri 17 od 72 testiranih (23,6 %) otrocih starih do enega leta. Pri otrocih v starostni skupini od 13 do 36 mesecev smo pikornaviruse dokazali pri 7 od 24 testiranih (29,2 %) otrocih, v najstarejši starostni skupini pa smo pikornaviruse dokazali pri 5 od 22 testiranih (22,7 %) otrocih. V slednji starostni skupini otrok smo pogosteje dokazali okužbe s hRV v primerjavi z EV (13,6 % proti 9,1 %). Primerljiv delež okužb, ki so jih povzročili EV in hRV smo dokazali pri otrocih mlajših od enega leta. Mediana starosti pri okužbah z EV je 10 mesecev ter pri okužbah s hRV 6 mesecev (slika 14).



Slika 14: Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost pikornavirusov v posamezni starostni skupini

Na sliki 15 je prikazan delež okužb, ki so jih povzročili različni pikornavirusi po mesecih (leto 2009). Okužbo s HPeV smo dokazali meseca julija. Največji delež okužb, ki so jih povzročili pikornavirusi, smo dokazali spomladi, z vrhom okužb maja. Okužbe, ki jih povzročajo pikornavirusi smo dokazali skozi vse leto, redkeje pa jeseni in pozimi.



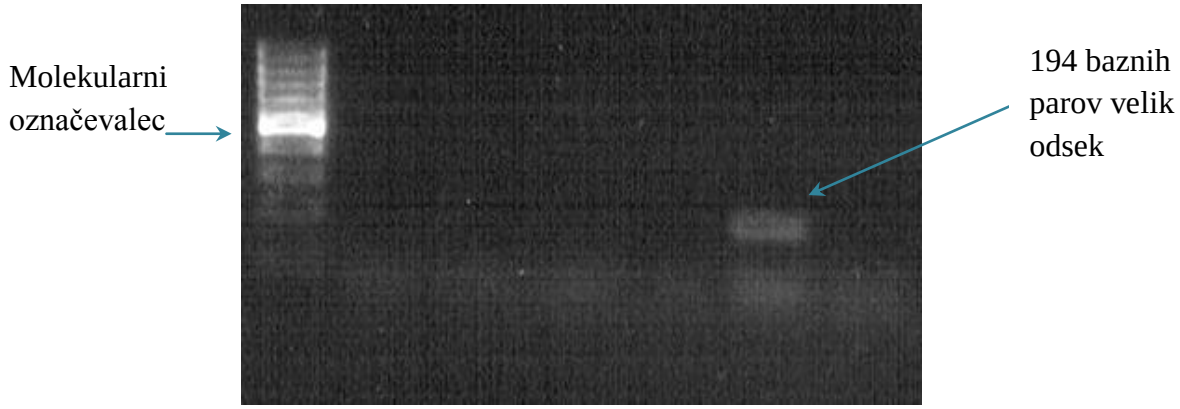
Slika 15: Odstotek pozitivnih vzorcev na prisotnost pikornavirusov v letu 2009

4.4 REZULTATI PRIMERJAVE DVEH METOD ZA DOKAZ PRISOTNOSTI RNA HPeV

S komercialnim kompletom reagentov Argene® (Biomérieux, Verniolle, Francija) smo dodatno želeli preveriti uspešnost naše metode. Tako smo izbrali sedem vzorcev in jih ponovno osamili po protokolu, ki ga priporoča komercialni proizvajalec. Ker se osamitev nukleinske kisline HPeV ni razlikovala med našim protokolom in protokolom, ki ga svetujejo komercialni proizvajalci, preostalih vzorcev nismo ponovno osamili. Vse izbrane vzorce smo nato pomnožili z RT-PCR v realnem času s komercialnim kompletom reagentov. Z obema metodama smo pomnožili RNA HPeV v enem vzorcu. Z našim RT-PCR v realnem času smo odčitali Ct pri 28,4 in s komercialnim kompletom reagentov smo odčitali Ct pri 33,9.

4.5 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Okužbo s HPeV smo dokazali v enem primeru. Z metodo RT-PCR v realnem času smo pomnožili 78 baznih parov dolgo nukleotidno zaporedje na genskem predelu 5' UTR. Da bi ugotovili, kateri genotip virusa smo pomnožili, smo s klasičnim RT-PCR pomnožili 194 baznih parov dolg del na genu 5'UTR. Slika 16 prikazuje agarozno gelsko elektroforezo s pomnoženim pridelkom RT-PCR reakcije.



Slika 16: Fotografija agarozne gelske elektroforeze pridelkov klasičnega enostopenjskega RT-PCR

Po očiščenju pridelka PCR in sekvenčni reakciji smo nukleotidno zaporedje analizirali s programskim paketom LaserGene (Dnastar, Madison, Winsconsin, ZDA). Pri poravnavi smo odstranili začetna oligonukleotida in tako dobili 145 baznih parov dolgo nukleotidno zaporedje. Le-tega smo primerjali z zaporedjem v genski banki GenBank preko medmrežnega servisa BLAST (Blast, 2011).

Naše zaporedje je bilo v 98 % sorodno izolatu (ref. št. GO183020.1) človeškega parehovirusa 1, ki so ga leta 2009 osamili na Nizozemskem. Od referenčnega seva se razlikuje na dveh mestih, delecija timina na mestu 30 ter substitucija timina s citozinom na mestu 60.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pikornavirusi so ubikvitarni virusi, ki povzročajo širok spekter bolezni, predvsem pri majhnih otrocih. Za človeške parehoviruse in enteroviruse so značilne blage okužbe dihal in prebavil ter okužbe osrednjega živčevja, ki so nevarne predvsem za dojenčke (Noordhoek in sod., 2008). Človeške rinoviruse in enteroviruse opisujejo kot pomembne povzročitelje bronhiolitisa pri otrocih starih do enega leta (Jacques in sod., 2006). Najpogosteje se pikornavirusne okužbe pojavljajo spomladi in jeseni (Winther in sod., 2006; Harvala in Simmonds, 2009). Velik delež okužb, ki jih povzročajo pikornavirusi je asimptomatskih, posledično je vlogo teh virusov pri nekaterih boleznih težko opredeliti (Olofsson in sod., 2011).

V preteklosti so bile okužbe s pikornavirusi velikokrat spregledane, zaradi manj občutljivih in specifičnih diagnostičnih metod ter zaradi nerazumevanja etiologije bolezni. Najpogosteje so uporabljali metodo osamitve virusa na celični kulturi, ki je časovno zamudna, rezultati so na voljo v nekaj tednih in je zato za diagnostiko težjih oblik bolezni neprimerna. Poleg tega pa za vse serotipe ni na voljo nevtralizacijskih protiteles (Harvala in sod., 2010).

V zadnjem desetletju so molekularne metode za dokazovanje pikornavirusnih okužb iz različnih kužnin pripomogle k boljšemu razumevanju virusnih povzročiteljev (Abed in Boivin, 2006). Najbolj razširjena metoda je RT-PCR v realnem času, ki je občutljiva, specifična ter hitra, saj poda rezultate le v nekaj urah (Harvala in Simmonds, 2009). Uporaba molekularnih metod je omogočila, odkritje v preteklosti neznanih genotipov človeških parehovirusov ter raziskovanje genetske variabilnosti teh virusov, kar je izrednega pomena pri epidemiološkem spremljanju kroženja virusov. Uporaba molekularnih metod je omogočila boljši vpogled v pogostnost pojavljanja okužb, ki jih povzročajo človeški parehovirusi (Harvala in Simmonds, 2009). To je potrdila tudi nizozemska raziskovalna skupina, ki je primerjala med seboj dve diagnostični metodi, in sicer osamitev virusa na celični kulturi ter PCR v realnem času. Izmed 248 vzorcih

iztrebkov, kjer so z RT-PCR dokazali RNA človeških parehovirusov, so z metodo osamitve virusa na celični kulturi prisotnost teh virusov potrdili le v 107 vzorcih (Benschop in sod., 2010). Čeprav človeške parehoviruse pogosto dokažejo pri bolnikih v kužninah dihal, se dokazovanje okužb uporablja le v redkih rutinskih laboratorijih (Harvala in sod., 2008).

V diplomski nalogi smo želeli z metodo RT-PCR v realnem času ugotoviti ali del virusnih okužb dihal in osrednjega živčevja povzročajo človeški parehovirusi. Želeli smo tudi določiti pogostnost okužb, ki jih povzročajo pikornavirusi (HPeV, hRV in EV) pri otrocih v Sloveniji ter določiti genotipe človeških parehovirusov, ki krožijo med slovenskimi otroci. Prav tako smo hoteli preverili občutljivost naše molekularne metode za dokazovanje prisotnosti človeških parehovirusov z diagnostičnim komercialnim kompletom reagentov.

V raziskavo smo vključili 118 kliničnih vzorcev bolnikov s sumom na okužbo dihal oz. s sumom na obolenje osrednjega živčevja, ki so bili poslani iz Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in iz drugih zdravstvenih ustanov. Preiskovanci so bili otroci stari do šest let, mediana starosti je bila 7,7 meseca. Razporeditev glede na spol je bila enakomerna. Večina kliničnih vzorcev (85 %) smo prejeli leta 2009 z najvišjo incidenco v spomladanskih in poletnih mesecih.

Okužbo s človeškim parehovirusom genotipa 1 smo dokazali v aspiratu traheje pri 5 mesecev stari deklici. Z metodo direktne imunofluorescence so bili rezultati negativni na preostale virusne povzročitelje okužb dihal in prav tako na okužbe s človeškimi rinovirusi in enterovirusi. Deklica je bila rojena kot nedonošenka s številnimi osnovnimi boleznimi. Po rojstvu je bila večkrat operirana zaradi kompleksne srčne napake, imela je kronično pljučno bolezen (bronhopulmonalno displazijo), zaradi katere je bila odvisna od mehanske ventilacije ter je imela hipertonični sindrom, zaradi večkratnih reanimacij. V času ko je bila odvzeta kužnina za preiskavo na respiratorne viruse, je bila deklica na mehanski ventilaciji in se ji je slabšala pljučna funkcija in saturacija kisika.
Podobne bolezenske znake so zasledili na Hrvaškem leta 2009. Sedem novorojenčkov se je v bolnišnici okužilo s človeškim parehovirusom genotipa 1 in vsi so kazali gastrointestinalne in/ali respiratorne bolezenske znake. Dva nedonošena dojenčka z

osnovnimi boleznimi (sepsa, periventrikularna leukomalacija, respiratorni distresni sindrom, prirojena srčna napaka, bronhopnevmonija, uporaba mehanske ventilacije) sta imela le okužbo dihal, drugi povzročitelji okužb dihal so bili izključeni. Ocenili so, da gre za srednje težko bolezen s klinični znaki rinitisa, pljučnega infiltrata, ugrezanjem ter plitkim in pospešenim dihanjem (Ljubin-Sternak in sod., 2011).

Z RT-PCR v realnem času smo dokazali RNA pikornavirusov v 24,6 % pregledanih vzorcih. Od tega smo okužbe z enterovirusi dokazali v 12,7 % vzorcev, okužbe s človeškimi rinovirusi v 11 % vzorcev ter eno okužbo (0,9 %) s človeškim parehovirusom. V našo raziskavo je bilo vključenih majhno število vzorcev dihal v primerjavi z angleško raziskavo, v katero so vključili 1299 vzorcev dihal. Okužbo s HPeV so dokazali pogosteje, in sicer pri 2,1 % bolnikov in vsi so bili mlajši od 5 let (Harvala in sod., 2008).
Med pregledanimi vzorci smo dokazali več okužb, ki so jih povzročili enterovirusi v primerjavi s človeškimi rinovirusi. Upoštevati moramo, da smo pomnoževali enteroviruse (3 pozitivni vzorci) tudi v vzorcih likvorja, človeške rinoviruse pa ne, saj se slednji ne pomnožujejo v osrednjem živčevju. V naši raziskavi smo dokazali nižjo pogostnost pojavljanja pikornavirusnih okužb, v primerjavi z drugimi raziskavami, kjer okužbe s pikornavirusi pri otrocih predstavljajo 30 – 50 % vseh okužb med povzročitelji okužb dihal (Jacques in sod., 2006; Chung in sod., 2007). Korejska raziskovalna skupina je pri otrocih starih do 5 let, ki so imeli okužbo spodnjih dihal, dokazala prisotnost RNA človeških rinovirusov v 27, 4 % in prisotnost RNA enterovirusov v 18,4 % vzorcih (Chung in sod., 2007). O podobni pogostnosti okužb poroča finska raziskovalna skupina, kjer so v dvoletni prospektivni študiji pri 293 otrocih dokazali 24 % okužb s človeškimi rinovirusi in 25 % okužb z enterovirusi (Jartti in sod., 2004).
Med 22 vzorci likvorja smo dokazali prisotnost RNA enterovirusov v 13, 6 % vzorcih. Število vzorcev v naši raziskavi je premajhno, da bi lahko sklepali o dejanski pogostnosti okužb osrednjega živčevja z enterovirusi. Raziskovalna skupina na Nizozemskem poroča o 14 % pogostnosti okužb osrednjega živčevja z enterovirusi pri otrocih do petega leta starosti (Wolthers in sod., 2008). Okužbe osrednjega živčevja s človeškimi parehovirusi najpogosteje povzroča genotip 3. V naši raziskovalni nalogi nismo dokazali prisotnost RNA človeškega parehovirusa genotipa 3 v vzorcih likvorja, so pa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v Laboratoriju za

molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisa in aidsa v obdobju od januarja do septembra 2009 v vzorcih likvorja dokazali prisotnost RNA človeškega parehovirusa genotipa 3 v 22 % vzorcih otrok starih manj kot en mesec (Fujs-Komloš in sod., 2010). Nizozemska triletna retrospektivna raziskava poroča o 4,6 % pogostnosti pojavljanja okužb človeškega parehovirusa genotipa 3, kjer so se okužbe pogosteje pojavljale leta 2004 in 2006 (8,2 % in 5,7 %) kot leta 2005 (0,4 %) (Wolthers in sod., 2008).

Prisotnost pikornavirusov smo dokazali v 29 vzorcih, ki so pripadali 28 bolnikom. V enem vzorcu smo dokazali prisotnost dveh virusov, in sicer enterovirus (C_t 20,7) in človeški rinovirus (C_t 17,7). Da bi ugotovili ali je prišlo do sočasne okužbe ali pa gre dejansko le za okužbo s človeškim rinovirusom, bi bilo potrebno določiti nukleotidno zaporedje, saj komercialni komplet za dokazovanje nukleinskih kislin enterovirusov lahko pomnožuje tudi nekatere serotipe človeških rinovirusov. Raziskovalna skupina iz Francije je med 192 otroki dokazala sočasne okužbe dihal z respiratornimi virusi v 40 (21 %) primerih. Od tega je bilo 37,5 % sočasnih okužb med človeškimi rinovirusi in enterovirusi (Jacques in sod., 2006).

V naši raziskavi je bila večina vzorcev aspiratov traheje, kjer smo RNA pikornavirusov dokazali v dvajsetih vzorcih. Za pikornavirusnimi okužbami je zbolelo 17,1 % več deklic kot dečkov, čeprav je bilo v raziskavo vključenih več dečkov. V nasprotju z našo raziskavo pa v literaturi najdemo podatke, kjer je za pikornavirusno okužbo zbolelo več dečkov kot deklic (Harvala in sod., 2008; Chung in sod., 2007).

Okužbo s človeškim parehovirusom smo dokazali pri 5 mesecev stari deklici. Raziskovalci poročajo o okužbi s človeškimi parehovirusi genotipa 1 pri otrocih starih od 0 do 35 mesecev (mediana 9,2 meseca) (van den Sanden in sod., 2008).
Preiskovance smo razdelili v tri starostne skupine. V starostno skupino otrok do enega leta starosti je spadalo več kot polovica otrok. Prav tako smo v tej starostni skupini dokazali največ pikornavirusnih okužb. Delež pikornavirusnih okužb je največji v starostni skupini od 13 do 36 mesecev, vendar pa je pogostnost okužb, ki jih povzročajo pikornavirusi primerljiva z ostalima starostnima skupinama.

Mediana starosti otrok z enterovirusnimi in človeškimi rinovirusnimi okužbami naše raziskave je 7,5 mesecev. Francoska raziskovalna skupina je dokazovala pikornavirusne okužbe pri otrocih do tretjega leta starosti, z mediano starosti 9 mesecev. Okužbe z enterovirusi so pogosteje dokazali pri otrocih do 6 mesecev, pri okužbah s človeškimi rinovirusi pa med starostnimi skupinami ni bilo signifikantnih razlik (Jacques in sod., 2006). Finska raziskovalna skupina je največ okužb s pikornavirusi dokazali v starostni skupini otrok od 24 do 36 mesecev, in sicer 52 %. Manjši delež pikornavirusnih okužb pa so dokazali v starostni skupini od 3 do 11 mesecev, in sicer 26 % okužb ter od 3 do 16 leta 22 % pikornavirusnih okužb (Jartti in sod., 2004).

Parehovirusne okužbe se pojavljajo čez vso leto, z višjo pogostnostjo pojavljanja v jesenskih in poletnih mesecih, je pa pogostnost pojavljanja okužb odvisna tudi od genotipa virusa (Harvala in sod., 2008). V naši raziskavi smo parehovirusno okužbo dokazali v mesecu juliju.

Znano je, da se okužbe s pikornavirusi pojavljajo skozi vso leto, s povečano pogostnostjo v jesenskih in spomladanskih mesecih (Noordhoek in sod., 2008; Uršič in sod., 2011; Jacques in sod., 2006). V skladu s podatki iz literature smo v naši raziskavi leta 2009 dokazali pikornavirusne okužbe spomladi, poleti, v zgodnji jeseni in v zgodnji zimi. Največjo aktivnost okužb z enterovirusi smo opazili v mesecu maju in juniju, kar je dokazala tudi nizozemska raziskovalna skupina, kjer so iz vzorcev iztrebkov največjo aktivnost enterovirusnih okužb opazili poleti (Benschop in sod., 2010). Uršič in sodelavci so v Sloveniji dokazali povečano pogostnost pojavljanja okužb s človeškimi rinovirusi v spomladanskih in jesenskih mesecih (Uršič in sod., 2011), v naši raziskovalni nalogi pa smo okužbe s človeškimi rinovirusi dokazali tudi poleti.

Eden od ciljev naše raziskave je bil tudi dokazovanje RNA človeških parehovirusov v vzorcih z dvema diagnostičnima metodama, in sicer z RT-PCR v realnem času, ki smo ga na novo uvedli v laboratoriju ter z diagnostičnim komercialnim kompletom reagentov. Rezultati pomnoževanja virusne nukleinske kisline se med metodama niso razlikovali. S tem smo potrdili uspešnost naše metode. Potrebno pa je upoštevati, da smo z obema metodama določili le eno okužbo s človeškim parehovirusom, kar je premalo za dejansko oceno občutljivosti diagnostičnih metod.

Z metodo določanja nukleotidnega zaporedja smo pozitiven vzorec človeškega parehovirusa genotipizirali. Virusno RNA smo pomnožili po postopku klasičnega RT-PCR, saj nam le-ta omogoča nadaljnjo analizo. Uporabili smo druge začetne oligonukleotide kot pri metodi RT-PCR v realnem času, ker je velikost tarčnega odseka večja. Pomnožili smo 194 baznih parov dolgo nukleotidno zaporedje, na predelu 5' nekodirajoče regije in ugotovili, da je naš izolat v 98 % soroden nizozemskemu izolatu človeškega parehovirusa genotipa 1.

V naši raziskavi smo dokazali le eno okužbo s človeškim parehovirusom genotipa ena, kar je v primerjavi s podatki iz drugih raziskav malo. Razlog je lahko v številu pregledanih vzorcev, ki je bilo manjše v primerjavi z drugimi raziskavami. Vzrok je lahko tudi v izboru preiskovancev, saj smo že na začetku same raziskave omejili izbor preiskovancev le na otroke, ki so potrebovali intenzivno zdravljenje na oddelku za Otroško kirurgijo UKC v Ljubljani. Prav tako smo za našo raziskavo izbrali največ vzorcev aspiratov traheje, in sicer le tiste vzorce, ki so bili negativni na preostale virusne povzročitelje okužb dihal, čeprav so dokazane tudi sočasne okužbe s človeškimi parehovirusi in drugimi povzročitelji okužb dihal.

Pikornavirusi so pomembni in pogosti povzročitelji okužb dihal, okužb osrednjega živčevja ter drugih obolenj pri majhnih otrocih, ampak so bili zaradi manj občutljivih diagnostičnih metod velikokrat spregledani. Z razvojem molekularnih tehnik se je poznavanje teh virusov izboljšalo. Splošna uporaba RT-PCR za dokaz pikornavirusov in molekularno tipiziranje v diagnostičnih laboratorijih, bi v prihodnje doprinesla k boljšemu vpogledu v pogostnost pojavljanja okužb in razširjenost pikornavirusnih genotipov ter razumevanju razvoja bolezni in posledično k uspešnejšemu zdravljenju. Obenem pa uporaba molekularnih tehnik lahko zagotavlja temelj za zmanjšano porabo antibiotikov in nepotrebnih dodatnih diagnostičnih analiz, skrajšano bolnišnično zdravljenje ter nenazadnje znižanje s tem povezanih stroškov obravnave bolnika.

5.2 SKLEPI

- Analizirali smo 118 vzorcev dihal in likvorjev, od tega največji delež poslanih iz Kirurške klinike, klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo UKC Ljubljana (80 %), ki so bili sprejeti v obdobju med februarjem 2007 in januarjem 2010, v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij v Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

- Okužbo s človeškim parehovirusom genotipa 1 smo dokazali v vzorcu aspirata traheje pri 5 mesecev stari deklici z več pridruženimi osnovnimi boleznimi.

- Z diagnostično metodo RT-PCR v realnem času smo dokazali okužbe pikornavirusov pri 24,6 % vzorcev. Človeški parehovirus smo dokazali v enem vzorcu oz. 0,9 %, človeške rinoviruse pa v 11,0 % vzorcev dihal. Enteroviruse smo dokazali v 12,7 % vzorcev, in sicer 10, 2 % v vzorcih dihal in 2,5 % v likvorju.

- Hkratno prisotnost RNA enterovirusa in človeškega rinovirusa smo dokazali v enem vzorcu.

- Za pikornavirusnimi okužbami je zbolelo več deklic (58,5 %) kot dečkov (41,4 %).

- Večina otrok (61 %) vključenih v raziskavo je bilo starih med 0 in 12 meseci, v tej starostni skupino smo dokazali tudi največje absolutno število otrok okuženih s pikornavirusi. Pikornaviruse smo po pogostnosti okužb najpogosteje dokazali pri otrocih med 13 in 36 meseci starosti.

- Okužbe s pikornavirusi smo dokazali spomladi, poleti, v zgodnji jeseni in v zgodnji zimi, s povečano pogostnostjo meseca maja in junija.

- Primerjava RT-PCR v realnem času, ki smo ga na novo uvedli v laboratoriju in komercialno dostopnega RT-PCR v realnem času za dokaz prisotnosti RNA človeških parehovirusov, smo dokazali, da sta metodi primerljivo občutljivi.

- Vzorec v katerem smo dokazali človeški parehovirus smo z metodo določanja nukleotidnega zaporedja genotipizirali in je bil v 98 % soroden nizozemskemu izolatu človeškega parehovirusa genotipa 1.

6 POVZETEK

Človeški parehovirusi so majhni RNA virusi brez ovojnice, ki spadajo v eno od najštevilčnejših virusnih družin *Picornaviridae*. Šestnajst genotipov povzroča širok spekter bolezenskih stanj, vse od okužb dihal in prebavil do težjih oblik bolezni osrednjega živčevja. Prav tako je velik delež okužb asimptomatskih, kar potrjuje visoka seropozitivnost med odraslo populacijo. Z največjo pogostnostjo se po celem svetu pojavlja genotip 1, ki večinoma povzroča blažje oblike bolezni pri otrocih. V zadnjem desetletju pa raziskovalci poročajo o vse večji pogostnosti okužb z genotipom 3, ki v večini primerov povzroča težje oblike bolezni pri dojenčkih. Razlike v patogenezi med genotipi pripisujejo drugačnemu celičnemu tropizmu virusov. Značilno je, da se okužbe pogosteje pojavljajo v jesenskih in spomladanskih mesecih. Podobne biološke in epidemiološke značilnosti imajo tudi drugi predstavniki pikornavirusne družine, in sicer enterovirusi in človeški rinovirusi.

Za dokazovanje pikornavirusnih okužb so nekoč uporabljali metodo osamitve virusa na celični kulturi, ki je manj občuljiva in so zato bile okužbe velikokrat spregledane. Razvoj molekularnih metod pa je doprinesel napredek k razumevanju virusov in z njimi povezanimi okužbami. Zdravljenje pikornavirusnih okužb je še v razvoju.

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti ali del okužb dihal in osrednjega živčevja pri hospitaliziranih otrocih v Sloveniji povzročajo človeški parehovirusi. Prav tako smo želeli določiti pogostnost pojavljanja pikornavirusnih okužb (človeški parehovirusi, enterovirusi in človeški rinovirusi). Za dokaz okužb s človeškimi parehovirusi smo želeli preveriti občutljivost metode RT-PCR v realnem času, ki smo ga razvili v laboratoriju, s komercialno dostopnim RT-PCR v realnem času. Zanimalo nas je tudi, kateri genotipi krožijo v slovenski populaciji otrok, zato smo določili genotipe človeških parehovirusov.

V raziskavo smo vključili 118 vzorcev dihal in likvorjev, ki so bili poslani iz Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (največ vzorcev iz Kirurške klinike, klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo). Z avtomatizirano napravo smo osamili celokupno RNA pikornavirusov in del tarčnega gena (5' nekodirajoče regije) pomnožili z metodo RT-PCR v realnem času. Za dokaz okužb s človeškimi parehovirusi smo izbrane

vzorce pomnožili tudi z RT-PCR v realne času s komercialnim kompletom reagentov ter s klasičnim RT-PCR. Slednjo metodo smo uporabili, da smo lahko v nadaljnje s sekvenčno reakcijo analizirali nukleotidna zaporedja človeških parehovirusov.

Z RT-PCR v realnem času smo RNA človeških parehovirusov dokazali v enem aspiratu traheje, pri pet mesecev stari deklici z več pridruženimi osnovnimi boleznimi. Z analizo nukleotidnega zaporedja in primerjavo le-tega v genski banki, smo ugotovili največjo sorodnost našega izolata s človeškim parehovirusom genotipa 1.

Okužbe s pikornavirusi smo dokazali v 24,6 % vzorcih, od tega 0,9 % okužb s človeškimi parehovirusi, 12,7 % okužb z enterovirusi in 11,0 % okužb s človeškimi rinovirusi. Najmlajši otrok je bil star en dan, najstarejši pa šest let. Otroke smo razdelili v tri starostne skupine, kjer smo pri otrocih med 13 in 36 mesecev starosti dokazali največ okužb s pikornavirusi. Kot poročajo drugi raziskovalci, smo tudi v naši raziskavi opazili največjo pogostnost okužb s pikornavirusi v obdobju od meseca aprila in do meseca septembra. Pokazali smo, da sta metodi za pomnoževanje RNA človeških parehovirusov med seboj primerljivo občutljivi.

Pikornavirusi so pomembni virusni patogeni, predvsem pri otrocih. V nalogi smo dokazali prvi primer okužbe dihal s človeškim parehovirusom genotipa 1. Za boljše razumevanje pikornavirusov in okužb, ki jih povzročajo so potrebne še nadaljnje raziskave. Zato je uporaba molekularnih tehnik pri okužbah s pikornavirusi neprecenljiva.

7 VIRI

Abed Y., Boivin G. 2006. Human parechovirus infection in Canada. Emerging Infectious Diseases, 12, 6: 969-975

Al-Sunaidi M., Williams C. H., Hughes P. J., Schnurr D. P., Stanway G. 2007. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. Journal of Virology, 81, 2: 1013-1021

Benschop K. S. M., Schinkel J., Minnaar R. P., Pajkrt D., Spanjerberg L., Kraakman H. C., Berkhout B., Zaaijer H. L., Beld M. G. H. M., Wolthers K. C. 2006. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. Clinical Infectious Diseases, 42, 2: 204-210

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

Bergovich S., Pangan J. 1968. Recoveries of virus from premature infants during outbreaks of respiratory disease: The relation of echo virus type 22 to disease of the upper and lower respiratory tract in the premature infant. Bulletin of the New York Academy of Medicine, 44, 4: 377-387

BLAST. 2011. Blast: Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda, NCBI - National Center for Biotechnology Information: 3 str.
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (7. maj 2011)

Boivin G., Abed Y., Boucher F. D. 2005. Human parechovirus 3 and neonatal infections. Emerging Infectious Diseases, 11, 1: 103-105

Butel J. S. 2010. Picornaviruses (enterovirus & rhinovirus groups). V: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. Weitz M., Lebowitz H. (eds.). 25th ed. New York City, McGraw-Hill: 491-507

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

Chung J., Han T. H., Kim S. W., Hwang E. 2007. Respiratory picornavirus infections in Korean children with lower respiratory tract infections. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 39, 3: 250-254

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

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

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

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

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

Harvala H., Robertson I., Chieochansin T., McWilliam Leitch E. C., Templeton K., Simmonds P. 2009. Specific association of human parechovirus type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. Journal of Infectious Diseases, 199, 12: 1753-176

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

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

Invitrogen. 2008. Real Time PCR: From theory to practice. Carlsbad, Invitrogen Corporation: 70 str.

Jacques J., Bouscambert-Duchamp M., Moret H., Carquin J., Brodard V., Lina B., Motte J., Andréoletti L. 2006. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. Journal of Clinical Virology, 35, 4: 463-466

Jartti T., Lehtinen P., Vuorinen T., Österback R., van den Hoogen B., Osterhaus A. D. M. E., Ruuskanen O. 2004. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. Emerging Infectious Diseases, 10, 6: 1095-1101

Krogerus C., Samuilova O., Pöyry T., Jokitalo, Hyypiä T. 2007. Intracellular localization and effects of individually expressed human parechovirus1 non-structural proteins. Journal of General Virology, 88, Pt. 3: 831-841

Landry M.L. 2010. The molecular diagnosis of parechovirus infection: Has the time come? Clinical Infectious Diseases, 50, 3: 362-362

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

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

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

NCBI. 2001. Schuler group: Real-Time quantitative reverse transcription PCR. Bethesda, NCBI - National Center for Biotechnology Information: 3 str. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml (21.nov.2011)

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

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

Noordhoek G. T., Weel J. F. L., Poelstra E., Hooghiemstra M., Brandenburg A.H. 2008. Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and

parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. Jurnal of Clinical Virology, 41, 2: 75-80

Oloffoson S., Brittain-Long R., Andersson L. M., Westin J., Lindh M. 2011. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 9, 8: 615-626

Renaud C., Kuypers J., Ficken E., Cent A., Corey L., Englund J.A. 2011. Introduction of a novel parechovirus RT-PCR clinical test in a regional medical center. Journal of Clinical Virology, 51, 1: 50-53

Scheltinga S. A., Templeton K. E., Beersma M. F. C., Claas E. C. J. 2004. Diagnosis of human metapneumovirus and rhinovirus in patients with respiratory tract infections by an internally controlled multiplex real-time RNA PCR. Journal of Clinical Virology, 33, 4: 306-311

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

Seitsonen J., Susi P., Heikkilä O., Sinkovits R. S., Laurinmäki, Hyypiä T., Butcher S. J. 2010. Interaction of $\alpha_V\beta_3$ and $\alpha_V\beta_6$ integrins with human parechovirus 1. Journal of Virology, 84, 17: 8509-8519

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

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

Tauriainen S., Oikarinen S., Taimen K., Laranne J., Sipilä M., Lönnrot M., Ilonen J., Simell O., Knip M., Hyöty H. 2008. Temporal relationship between human parechovirus 1 infection and otitis media in young children. Journal of Infectious Diseases, 198, 1: 35-40

Tauriainen S., Martiskainen M., Oikarinen S., Lönnrot M., Viskari H., Ilonen J., Simell O., Knip M., Hyöty H. 2007. Human parechovirus 1 infections in young children-No association with type 1 diabetes. Journal of Medical Virology, 79, 4: 457-462

Uršič T., Jevšnik M., Žigon N., Krivec U., Borinc Baden A., Praprotnik M., Petrovec M. 2011. Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. Journal of Medical Virology, 84, 1: 99-108

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

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

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

Winther B., Hayden F. G., Hendley J. O. 2006. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudial surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illnes and effect of season. Journal of Medical Virology, 78, 5: 644-650

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Miroslavu Petrovcu za prevzeto mentorstvo in nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Zahvalila bi se za potrpežljivost in ves dragocen čas, ki mi ga je namenil.

Zahvaljujem se prof. dr. Tatjani Avšič Županc, za strokoven in hiter pregled diplomske naloge.

Najlepša hvala Tini Uršič za uspešno vodenje in praktično usposabljanje v laboratoriju pri praktičnem delu naloge ter za nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala vsem zaposlenim v laboratoriju. Moniki, Nini, Snežani in Katji hvala za pomoč pri nastajanju diplomskega dela, za spodbudne in tolažilne besede. Zahvaljujem se vam za vso pridobljeno znanje, ki ste ga z veseljem delile z mano.

Iz srca se zahvaljujem staršem, ki sta potrpežljivo čakala in dočakala zaključek mojega študija ter za vso finančno in moralno podporo. Sama beseda »hvala« ni dovolj, da vama povem koliko sem vama hvaležna. Hvala družini, ki je verjela vame.

Zahvaljujem se vsem prijateljem, ki so me spodbujali tekom študija in mi nudili moralno podporo pri nastajanju diplomskega dela. Hvala sošolkam in sošolcem za prelepe študentske dni.

Iskrena hvala vsem!

PRILOGA

Priloga A: Seznam 118 kliničnih vzorcev testiranih z RT-PCR v realnem času. Okrajšave: HPeV – človeški parehovirusi, hRV – človeški rinovirusi, EV – enterovirusi, NEG – negativno, POZ – pozitivno, b. NF – bris nosnega dela žrela, b. žrela – bris žrela.

Št.	Spol	Starost	Klinika	Vzorec	HPeV (Ct)	hRV (Ct)	EV (Ct)
1	M	12 dni	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
2	Ž	13 mesecev	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
3	Ž	3 leta	Otr. krg.	likvor	NEG	NEG	NEG
4	M	5 dni	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
5	Ž	20 dni	ginekol.	likvor	NEG	NEG	NEG
6	Ž	21 mesecev	SB Celje	likvor	NEG	NEG	NEG
7	Ž	8 mesecev	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	POZ (32,8)
8	M	2 leti	Inf. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
9	Ž	2 meseca	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
10	M	2 meseca	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
11	Ž	3 leta	Otr. krg.	likvor	NEG	NEG	NEG
12	M	21 mesecev	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
13	Ž	6 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	POZ (10,8)
14	M	7 dni	UKC MB	likvor	NEG	NEG	NEG
15	Ž	3 mesece	SB Ptuj	likvor	NEG	NEG	NEG
16	Ž	2 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
17	Ž	2 meseca	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
18	Ž	2 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
19	Ž	4 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
20	M	3 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
21	Ž	14 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
22	Ž	7 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
23	M	2 leti	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
24	Ž	7 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
25	M	5 dni	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
26	Ž	15 dni	Otr. krg.	likvor	NEG	NEG	NEG
27	M	2 leti	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
28	M	3 leta	Inf. kl.	b. žrela	NEG	NEG	NEG
29	M	10 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
30	Ž	7 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
31	M	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (32,6)	NEG
32	M	17 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
33	Ž	1 dan	Nevrol.	likvor	NEG	NEG	NEG
34	M	6 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
35	M	24 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Seznam 118 kliničnih vzorcev testiranih z RT-PCR v realnem času. Okrajšave: HPeV – človeški parehovirusi, hRV – človeški rinovirusi, EV – enterovirusi, NEG – negativno, POZ – pozitivno, b. NF - bris nosnega dela žrela, b. žrela – bris žrela.

Št.	Spol	Starost	Klinika	Vzorec	HPeV (Ct)	hRV (Ct)	EV (Ct)
36	Ž	2 meseca	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
37	M	8 mesecev	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
38	M	7 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
39	Ž	2 meseca	ginekol.	AT	NEG	NEG	NEG
40	Ž	16 mesecev	Otr. krg.	b. NF	NEG	POZ (28,3)	NEG
41	M	1 dan	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
42	M	6 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (21,2)	NEG
43	Ž	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
44	Ž	2 leti	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	POZ (28,0)
45	M	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
46	Ž	8 mesecev	Ped. kl.	BAL	NEG	NEG	NEG
47	M	6 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (26,6)	NEG
48	Ž	4 mesece	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	POZ (30,1)
49	M	10 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	POZ (26,6)
50	Ž	3 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
51	Ž	4 mesece	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
52	Ž	3 mesecev	ginekol.	AT	NEG	NEG	POZ (29,1)
53	M	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (28,0)	NEG
54	M	6 mesecev	SB Murska Sobota	likvor	NEG	NEG	POZ (31,9)
55	M	8 mesecev	Ped. kl.	BAL	NEG	NEG	NEG
56	Ž	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
57	M	21 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
58	Ž	2 meseca	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (17,7)	POZ (20,7)
59	Ž	3 leta	SB Šempeter pri Gorici	likvor	NEG	NEG	POZ (33,5)
60	Ž	1 leto	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	POZ (27,0)
61	Ž	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
62	M	1 leto	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
63	M	1 leto	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
64	M	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
65	M	6 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (25,6)	NEG
66	Ž	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
67	M	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
68	Ž	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
69	M	8 mesecev	Ped. kl.	BAL	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Seznam 118 kliničnih vzorcev testiranih z RT-PCR v realnem času. Okrajšave: HPeV – človeški parehovirusi, hRV – človeški rinovirusi, EV – enterovirusi, NEG – negativno, POZ – pozitivno, b. NF – bris nosnega dela žrela, b.žrela – bris žrela.

Št.	Spol	Starost	Klinika	Vzorec	HPeV (Ct)	hRV (Ct)	EV (Ct)
70	M	3 leta	Otr. krg	BAL	NEG	NEG	NEG
71	M	13 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
72	M	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
73	Ž	2 meseca	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (36,3)	NEG
74	Ž	6 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (24,7)	NEG
75	M	6 dni	Otr. krg.	BAL	NEG	NEG	NEG
76	Ž	5 mesecev	Otr. krg.	AT	POZ (28,4)	NEG	NEG
77	M	2 dni	Otr. krg.	b. žrela	NEG	NEG	NEG
78	Ž	5 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	POZ (30,0)
79	M	14 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
80	M	2 leti	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
81	M	13 dni	Ped. kl.	likvor	NEG	NEG	NEG
82	Ž	4. mesece	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
83	M	20 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
84	Ž	3 leta	Otr. krg.	BAL	NEG	POZ (30,5)	NEG
85	Ž	6 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
86	M	3 leta	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
87	Ž	6 mesecev	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
88	Ž	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
89	Ž	6 mesecev	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
90	M	12 dni	UKC MB	likvor	NEG	NEG	NEG
91	Ž	6 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (36,1)	NEG
92	M	9 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
93	Ž	8 mesecev	Otr. krg.	AT	NEG	POZ (19,8)	NEG
94	M	5 let	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	POZ (25,7)
95	Ž	3 leta	Otr. krg.	likvor	NEG	NEG	NEG
96	M	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
97	Ž	3 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
98	M	4 dni	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
99	Ž	4 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
100	M	14 mesecev	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
101	Ž	23 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
102	M	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
103	M	4 mesece	Otr. krg.	b. žrela	NEG	NEG	POZ (29,2)
104	M	4 mesece	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
105	M	5 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Seznam 118 kliničnih vzorcev testiranih z RT-PCR v realnem času. Okrajšave: HPeV – človeški parehovirusi, hRV – človeški rinovirusi, EV – enterovirusi, NEG – negativno, POZ – pozitivno, b. NF- bris nosnega dela žrela, b. žrela – bris žrela.

Št.	Spol	Starost	Klinika	Vzorec	HPeV (Ct)	hRV (Ct)	EV (Ct)
106	M	22 mesecev	Otr. krg.	b. NF	NEG	POZ (35,2)	NEG
107	Ž	2 meseca	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
108	Ž	5 let	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	NEG
109	M	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
110	M	3 leta	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
111	Ž	5 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
112	M	2 leti	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
113	Ž	0 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
114	M	5 dni	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
115	M	23 mesecev	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	POZ (30,8)
116	M	5 let	Otr. krg.	b. NF	NEG	NEG	POZ (31,9)
117	Ž	1 mesec	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG
118	M	1 mesec	Otr. krg.	AT	NEG	NEG	NEG