

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sergeja MAR

**MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA ČLOVEŠKIH
RINOVIRUSOV V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sergeja MAR

**MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA ČLOVEŠKIH RINOVIRUSOV V
SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HUMAN RHINOVIRUSES IN
SLOVENIA**

M. SC. THESIS
Master Study Programme Field Microbiology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za Mikrobiologijo in Imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Za mentorja magistrskega dela je imenovan prof. dr. Miroslav Petrovec, za somentorico dr. Tina Uršič ter za recenzentko prof. dr. Tatjana Avšič Županc.

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

Somentorica: dr. Tina Uršič, univ. dipl. mikrobiol.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

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

Član: prof. dr. Miroslav PETROVEC, dr. med.

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

Članica: dr. Tina URŠIČ, univ. dipl. mikrobiol.

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

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC, univ. dipl. biol.

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Sergeja Mar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 578.2.083:578.835.2(497.4)(043)=163.6
- KG virusi/rinovirusi/HRV/okužbe dihal/pediatrični bolniki/bronhioleitis/ molekularne metode/ verižna reakcija s polimerazo/ klasični PCR/RT-PCR v realnem času/ določanje nukleotidnega zaporedja/ HRV-A/ HRV-B/ HRV-C/sočasne okužbe
- AV MAR, Sergeja, dipl. mikrobiol. (UN)
- SA PETROVEC, Miroslav (mentor)/URŠIČ, Tina (somentorica)/AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
- LI 2013
- IN MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA ČLOVEŠKIH RINOVIRUSOV V SLOVENIJI
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
- OP X, 64 str., 10 pregl., 10 sl., 3 pril., 65 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Rinoviruse (HRV) poznamo kot najpogostejše povzročitelje prehlada ter jih uvrščamo v družino *Picornaviridae*. Taksonomsko jih delimo v tri skupine: rinovirusi vrste A (HRV-A), B (HRV-B) in C (HRV-C). V okviru magistrskega dela smo dokazovali prisotnost HRV v vzorcih dihal pediatričnih bolnikov, ki so bili poslani iz Univerzitetnega Kliničnega centra Ljubljana. V raziskavo smo vključili tudi kontrolno skupino, ki so jo oblikovali otroci brez znakov okužbe dihal. Zanimalo nas je kateri genotipi HRV najpogostejše povzročajo okužbe dihal pri bolnih in zdravih otrocih. Posebej smo se osredotočili na skupino HRV-C, ki jo vse pogostejše povezujejo s težkimi okužbami spodnjih dihal. V raziskavo smo vključili 549 vzorcev dihal (bolni 320; hudo bolni 73; zdravi 156). Prisotnost HRV smo dokazovali z metodo RT-PCR v realnem času ter jih dokazali v približno enakem deležu (bolni, 27,2 %; hudo bolni 28,8 %; zdravi, 10,9 %). V skupini bolnih otrok smo dokazali največ HRV-A (56,8 %), sledili so HRV-C (37 %) ter HRV-B (4,9 %), v enem primeru smo dokazali prisotnost enterovirusa (EV). V skupini hudo bolnih otrok smo dokazali največji delež HRV-C (57,9 %) ter manjši delež HRV-A (42,1 %). V skupini zdravih otrok smo dokazali največji delež HRV-A (75 %) ter manjši delež HRV-B in HRV-C (18,8 % in 6,3 %). HRV-C kažejo na največjo pogostnost pojavljanja v spomladanskih mesecih, HRV-A v jesenskih in zimskih mesecih ter HRV-B v jesenskih mesecih. Največ sočasnih okužb smo dokazali v skupini bolnih otrok, medtem ko v skupini hudo bolnih rinovirusi sami povzročajo okužbe dihal.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2

DC UDC 578.2.083:578.835.2(497.4)(043)=163.6

CX viruses/rhinoviruses/HRV/infections/upper respiratory tract/lower respiratory tract/
molecular methods/polymerase chain reaction/classic PCR/real time RT-PCR/
sequencing/HRV-A/HRV-B/HRV-C/coinfections

AU MAR, Sergeja

AA PETROVEC, Miroslav (supervisor)/URŠIČ, Tina (co-advisor)/AVŠIČ ŽUPANC,
Tatjana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2013

TY MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HUMAN RHINOVIRUSES IN SLOVENIA

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes Field Microbiology)

NO X, 64 p., 10 tab., 10 fig., 3 ann., 65 ref.

LA sl

Al sl/en

AB Rhinoviruses (HRV) are known as the important etiological agents of the common cold. They are members of the family *Picornaviridae* and can be classified in three species, HRV-A, HRV-B and HRV-C. The aim of our study was to determine the prevalence of rhinoviruses infections in children with lower respiratory diseases. The specimens were collected from hospitalized pediatric patients admitted to University Medical Center Ljubljana. As control we enrolled children with no current ARI symptoms. Our study goal was to determine which of known HRV species is the etiologic agent in acute lower respiratory tract infection. Specifically, we considered the novel species HRV-C, because it is important causes of upper and lower respiratory illnesses. We enrolled 549 samples of nasopharyngeal swabs (normal ill 320; very ill 73; healthy 156). The samples were tested with RT-PCR. HRVs were detected in all groups in equal shares (normal ill 27,2 %; very ill 28,8 %; healthy 10,9 %). In the group of normal ill patients we detected HRV-A in 56,8 %, HRV-C in 37 % and HRV-B in 4,9 %. In one case we detected enterovirus (EV). In the group of very ill patients we detected HRV-A in the highest proportion (75 %) and smaller proportion of HRV-B and HRV-C (18,8 % and 6,3 %). HRV-C shows peaks in spring. HRV-A and HRV-B show a similar seasonality in fall and winter. Coinfections were detected in group of normal ill patients. In the group of very ill patients HRV causes illnesses alone.

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 DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED	3
2.2 ZNAČILNOSTI ČLOVEŠKIH RINOVIRUSOV	4
2.2.1 Zgradba in organizacija virusnega genoma	4
2.2.2 Pomnoževanje virusnega genoma	5
2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV	6
2.3.1 Trenutne molekularne metode in genotipizacija HRV-C	7
2.3.2 Genetska raznolikost in rekombinacije v evoluciji HRV-C	7
2.4 EPIDEMIOLOGIJA	8
2.5 PATOGENEZA	9
2.5.1 Zgornja dihal	9
2.5.2 Spodnja dihal	9
2.6 KLINIČNA SLIKA	10
2.6.1 Okužbe spodnjih in zgornjih dihal	10
2.6.2 Kronične pljučne bolezni	11
2.6.3 Okužbe, ki jih povzročajo rinovirusi vrste C	12
2.7 ZDRAVLJENJE	12
2.7.1 Preventiva	13
2.8 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA	14
2.8.1 Vzorčenje	14
2.8.2 Celične kulture	14
2.8.3 Molekularne metode	14

2.8.4	Tipiziranje.....	15
3	MATERIALI IN METODE.....	16
3.1	PREISKOVANCI IN VZORCI.....	16
3.2	METODE DELA.....	17
3.2.1	Osamitev celokupne nukleinske kisline	17
3.2.2	Pomnoževanje virusne nukleinske kisline	18
3.2.2.1	Teoretične osnove – verižna reakcija s polimerazo in predhodno reverzno transkripcijo.....	18
3.2.2.2	Pomnoževanje tarčnega odseka HRV z RT-PCR v realnem času.....	20
3.2.2.3	Pomnoževanje tarčnega odseka HRV s klasičnim PCR.....	23
3.2.3	Agarozna gelska elektroforeza	24
3.2.4	Določanje nukleotidnega zaporedja.....	24
3.2.4.1	Teoretične osnove.....	24
3.2.4.2	Čiščenje pridelkov PCR	25
3.2.4.3	Določanje koncentracije očiščenih pridelkov PCR	25
3.2.4.4	Sekvenčna reakcija	25
3.2.4.5	Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije.....	26
3.2.4.6	Določanje nukleotidnega zaporedja očiščenih pridelkov PCR.....	27
4	REZULTATI.....	28
4.1	VZORCI IN PREISKOVANCI.....	28
4.2	DOKAZ PRISOTNOSTI RINOVIRUSOV Z RT-PCR V REALNEM ČASU IN KLASIČNIM RT-PCR TER DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA DELA REGIJE 5' NCR	30
4.3	ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	32
4.4	SEZONSKA RAZPOREDITEV RINOVIRUSNIH GENOTIPOV	34
4.5	SOČASNE OKUŽBE Z DRUGIMI VIRUSNIMI POVZROČITELJI OKUŽB DIHAL	39
5	RAZPRAVA.....	42
6	SKLEPI.....	50
7	POVZETEK	51
8	VIRI	52
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz začetnih oligonukleotidov in oligonukleotidne sonde, ki so bili uporabljeni pri RT-PCR v realnem času, za dokaz rinovirusov. F - pozitivno usmerjeni začetni oligonukleotidi (angl. <i>forward primer</i>), P - sonda (angl. <i>probe</i>), R - negativno usmerjeni začetni oligonukleotidi (angl. <i>reverse primer</i>), HRV - rinovirus, FAM - reporterski fluorogen (karboksi-fluorescein), BBQ - zaviralni fluorogen (angl. <i>black berryquencher</i>).....	21
Preglednica 2: Reakcijska mešanica za RT-PCR v realnem času za dokazovanje prisotnosti rinovirusov. HRV - rinovirus.	22
Preglednica 3: Prikaz stopenj reakcije RT-PCR v realnem času za dokaz prisotnosti HRV. HRV - rinovirus.	22
Preglednica 4: Reakcijska mešanica za klasični PCR za dokaz prisotnosti HRV. HRV - rinovirus. ...	23
Preglednica 5: Prikaz poteka klasične reakcije RT-PCR za dokaz prisotnosti HRV. HRV - rinovirus.	24
Preglednica 6: Reagenti, ki sestavljajo reakcijsko mešanico za sekvenčno reakcijo.....	26
Preglednica 7: Potek sekvenčne reakcije za določanje nukleotidnega zaporedja HRV. HRV – rinovirus.	26
Preglednica 8: Pojavnost različnih vrst virusov glede na mesece, v vzorcih dihal bolnih otrok v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011. HRV – rinovirus, EV – enterovirus.	35
Preglednica 9: Pojavnost HRV glede na mesece, v vzorcih dihal hudo bolnih otrok v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011. HRV – rinovirus.....	36
Preglednica 10: Pojavnost HRV glede na mesece, v vzorcih dihal zdravih otrok v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011. HRV – rinovirus.....	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba genoma HRV-B-35 (Palmenger in sod., 2010: 1192).....	4
Slika 2: Zgradba genoma HRV-C-15 (Bochkov in Gern, 201: 488).....	5
Slika 3: Virusno pomnoževanje v epitelijskih celicah dihal pri človeku (Jacobs in sod., 2013: 138)....	6
Slika 4: Delež poslanih vzorcev dihal glede na zdravstveno stanje otrok.	28
Slika 5: Delež deklic in dečkov, pri katerih smo po analizi s klasičnim RT-PCR v vzorcih dihal dokazali prisotnost HRV ter mediana starosti otrok v posamezni skupini bolnikov. HRV – rinovirus.	29
Slika 6: Število vzorcev v katerih smo z RT-PCR v realnem času in s klasičnim RT-PCR dokazali prisotnost HRV ter število in delež dobljenih nukleotidnih zaporedij. HRV – rinovirus.....	31
Slika 7: Delež različnih vrst virusov glede na zdravstveno stanje otrok. HRV - rinovirus, EV - enterovirus.....	32
Slika 8: Število različnih vrst genotipov virusov, ki smo jih določili v vseh vzorcih, dihal v katerih smo dokazali prisotnost HRV in EV. HRV - rinovirus, EV - enterovirus.....	33
Slika 9: Število vseh vrst virusov dokazanih v vzorcih dihal vseh pediatričnih bolnikov, sprejetih v bolnišnično oskrbo v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011. HRV – rinovirus, EV – enterovirus.....	38
Slika 10: Število sočasnih okužb HRV z drugimi virusnimi povzročitelji okužb dihal, glede na vrsto HRV in zdravstveno stanje otrok ter število vseh sočasnih okužb v skupini bolnih, hudo bolnih in zdravih pediatričnih bolnikov. HRV - rinovirus.....	41

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam 87 vzorcev dihal bolnih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. AdV – adenovirus, HRV – rinovirus, HBoV – človeški bokavirus, HCoV – človeški koronavirus, RSV – respiratorni sincicijski virus, PIV – virus parainfluenze..... 61

Priloga B: Seznam 19 vzorcev dihal hudo bolnih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. HRV – rinovirus. 63

Priloga C: Seznam 17 vzorcev dihal zdravih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. HRV – rinovirus, AdV – adenovirus, PIV – virus parainfluenze, HBoV – človeški bokavirus, HCoV – človeški koronavirus. 64

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AdV	adenovirus
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>complementary DNA</i>)
ddNTP	dideoksinukleotid fosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid fosfat
EV	enterovirus
HBECs	človeške bronhialne epiteljske celice
HBoV	človeški bokavirus
HCoV	človeški koronavirus
HRV	rinovirus
ICAM-1	adhezivne molekule tipa 1 (angl. <i>intracellular adhesion molecule 1</i>)
Inf A/B	virus influence tipa A in B
IRES	ribosomalno vstopno mesto tipa I (angl. <i>type 1 internal ribosomal entry site</i>)
LDLR	lipoproteinski receptorji z nizko gostoto (angl. <i>low-density lipoprotein receptor</i>)
NCR	nekodirajoča regija (angl. <i>noncoding region</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PIV	virus parainfluence
RNA	ribonukleinska kislina
RSV	respiratorni sincicijski virus
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
VP	virusni protein (angl. <i>viral protein</i>)
VODP	raziskava virusne okužbe dihal in prebavil

1 UVOD

Rinoviruse uvrščamo v rod *Enterovirus* in družino *Picornaviridae*. So majhni virusi, brez ovojnice z ikozaedrično kapsido, ki obdaja ribonukleisko kislino (angl. *ribonucleic acid*, RNA) (Arden in sod., 2006). Znani so, kot najpogostejši povzročitelji prehladov povsod po svetu in pri vseh starostnih skupinah. Do nedavnega so jih povezovali le z blagimi okužbami zgornjih dihal, vse več raziskav pa rinoviruse povezuje s težkimi okužbami spodnjih dihal. Z razvojem in uveljavo molekularnih metod v kliničnih laboratorijih, je sledilo odkritje nove skupine rinovirusov, imenovane rinovirusi vrste C (HRV-C) (Bochkov in Gern, 2012). V številnih raziskavah so raziskovalci potrdili obstoj skupine virusov, ki je genetsko zelo podobna že poznanima skupinama rinovirusov vrste A in B (HRV-A in HRV-B), vendar lahko povzročajo tudi okužbe spodnjih dihal, ki jih do sedaj niso povezovali z rinovirusi (Iwane in sod., 2011; Fry in sod., 2011; Calvo in sod., 2009; Renwick in sod., 2007). Rinovirusi vrste C povzročajo okužbe dihal predvsem pri mlajših otrocih, imunsko oslabljenih posameznikih in starejših osebah (Jacobs in sod., 2013).

Številne raziskave so potrdile, da so rinoviruse vrste C pomembni patogeni. Ločijo jih v dve podskupini, ki ju imenujemo skupina Ca in Cc. Rinovirusi so gensko zelo raznolika skupina virusov, saj zaradi selektivnih pritiskov, ki so jim podvrženi, pogosto mutirajo tudi že znani sevi (Bochkov in Gern., 2012).

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela z naslovom »Molekularna epidemiologija človeških rinovirusov v Sloveniji«, je bil ugotoviti kateri genotipi rinovirusov se pojavljajo pri bolnih in zdravih otrocih. V ta namen smo, z določanjem 390 baznih parov dolgega nukleotidnega zaporedja 5' nekodirajoče regije rinovirusnega genoma, določali vrste rinovirusov pri otrocih, ki so zaradi okužbe dihal sprejeti na Pediatrično kliniko, na Klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo ter na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetnega Kliničnega Centra Ljubljana. Dokazane vrste rinovirusov smo primerjali z vrstami rinovirusov, ki smo jih določili pri zdravih otrocih, sprejetih na Klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, zaradi elektivnega kirurškega posega.

Zanimalo nas je ali je delež otrok, pri katerih smo dokazali rinoviruse vrste C drugačen glede na to ali so otroci zdravi ali bolni, oziroma ali je delež otrok, pri katerih smo dokazali okužbo

z rinovirusi vrste C, povezan s težjim kliničnim potekom okužbe dihal. Pričakovali smo, da bomo največ rinovirusov vrste C dokazali pri otrocih s težkim potekom okužbe dihal. Rezultate naše raziskave smo primerjali s pojavnostjo rinovirusov vrste C v drugih raziskavah po svetu. Zanimalo nas ali je pogostnost pojavljanja rinovirusov vrste C enaka po vsem svetu. Glede na poznane rinovirusne vrste C smo želeli ugotoviti kateri se pojavljajo najpogosteje, pri nas in drugje po svetu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Prve rinoviruse (HRV) so odkrili leta 1953. Danes jih poznamo kot najpogostejše povzročitelje prehlada, saj jih dokažemo pri več kot polovici prehladnih obolenj. Okužbe, ki jih povzročajo človeški rinovirusi, so pogost vzrok obiskov zdravstvenih ustanov in posledične odsotnosti na delovnih mestih, s tem so posredno povezani z velikimi finančnimi obremenitvami tako v zdravstvu kot v gospodarstvu (Jacobs in sod., 2013).

Skoraj 60 let po odkritju prvih rinovirusov, še vedno ni na voljo cepiva za preprečevanje okužb (Pappas in sod., 2008), so pa v uporabi nova zdravila, ki omogočajo njihovo zdravljenje (Jacobs in sod., 2013). V zadnjem času nove molekularne metode omogočajo revolucionarna odkritja, povezana z virusi, ki povzročajo okužbe dihal. Tako so ugotovili, da rinovirusi ne povzročajo samo okužb zgornjih dihal, temveč so pomembni povzročitelji okužb spodnjih dihal. Povezujejo jih s kroničnimi pljučnimi boleznimi, razvojem astme ter z resnejšimi okužbami kot sta bronhiolitis pri dojenčkih in otrocih ter virusna pljučnica pri starejših in imunsko oslabljenih odraslih, ki se pogosto konča s smrtjo (Pappas in sod., 2008).

Prvi rinovirus je bil odkrit leta 1953 in do leta 1987 so bili rinovirusi razvrščeni v približno 100 različnih serotipov. Viruse so antigensko razvrščali z nevtralizacijskimi testi ter s serološkimi metodami, kjer so izkoriščali navzkrižno reaktivnost med posameznimi serotipi. Serotipe so razvrščali na podlagi specifičnosti celičnih receptorjev, imenovanih znotrajcelične adhezivne molekule tipa 1 (angl. *intracellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) in lipoproteinskih receptorjev z nizko gostoto (angl. *low-density lipoprotein receptor*, LDLR) ter na podlagi občutljivosti na protivirusne kapsidne komponente. Sledilo je določanje nukleotidnega zaporedja prototipov in kliničnih izolatov, kar je razkrilo dve ločeni skupini rinovirusov, rinoviruse vrste A (HRV-A) in rinoviruse vrste B (HRV-B) (Bochkov in Gern, 2012).

Razvoj visoko občutljivih molekularnih metod za dokazovanje nukleinskih kislin rinovirusov iz kliničnih vzorcev, je omogočil odkritje nove vrste rinovirusov, ki so jo poimenovali rinovirusi vrste C. Rinovirusov vrste C ne moremo osamiti na standardnih celičnih kulturah, kar je bil glavni vzrok za kasnejše odkritje (Lamson in sod., 2006). Skupino C so dokončno potrdili na podlagi sedmih genomov rinovirusov vrste C, ki so jim v celoti določili

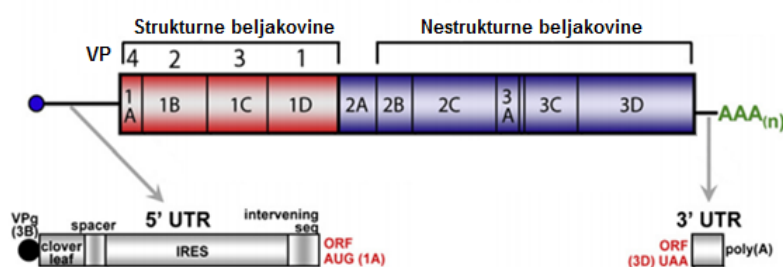
nukleotidno zaporedje. S primerjalnimi analizami so lahko dokončno uvrstili rinoviruse v tri filogenetsko ločene skupine (Palmenberg in sod., 2009).

2.2 ZNAČILNOSTI ČLOVEŠKIH RINOVIRUSOV

2.2.1 Zgradba in organizacija virusnega genoma

Rinoviruse uvrščamo v družino *Picornaviridae* in rod *Enterovirus*. Genom je pozitivno usmerjena, enoverižna molekula ribonukleinske kisline (angl. *ribonucleic acid*, RNA), ki je dolga približno 7200 baznih parov. Sestoji iz enega samega gena, ki kodira encim proteazo in omogoča sintezo 11 beljakovin (Palmenberg in sod., 2010).

5' nekodirajoča regija (angl. *5' noncoding region*, 5' NCR) je dolga približno 650 baznih parov, sledi ji odprt bralni okvir, ki je dolg približno 6500 baznih parov in kodira več kot 2100 različnih aminokislin. Na koncu je priključena še 3' nekodirajoča regija (angl. *3' noncoding region*, 3' NCR), ki jo gradi okoli 50 baznih parov in se zaključí z zanko. Na začetku 5' NCR regije, se nahaja majhna virusna beljakovina (VPg), ki deluje kot začetni oligonukleotid za pomnoževanje virusnega genoma (Palmenberg in sod., 2010). Temu sledi RNA v obliki štiriperesne deteljice (angl. *cloverleaf*), ki je potrebna za virusno pomnoževanje ter ribosomalno vstopno mesto tipa I (angl. *type 1 internal ribosomal entry site*, IRES), ki vsebuje pet ohranjenih regij za prevajanje RNA (Lau in sod., 2007).

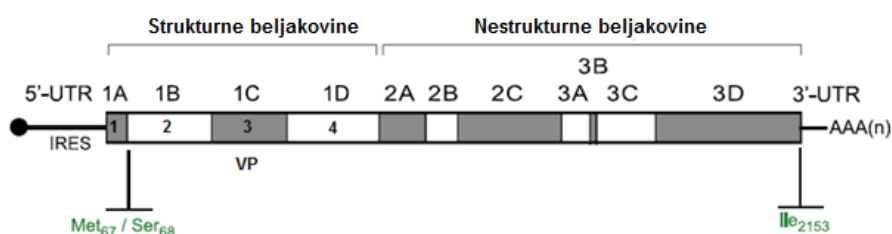


Slika 1: Zgradba genoma HRV-B-35 (Palmenger in sod., 2010: 1192).

Virusno kapsido, ki obdaja genom, gradijo štiri strukturne beljakovine VP1, VP2, VP3 ter VP4 (angl. *viral protein*, VP), ostale nestrukturne beljakovine pa so vključene v virusno pomnoževanje. Strukturne beljakovine VP1, VP2 in VP3 skrbijo za virusno antigensko raznolikost, medtem ko VP4 povezuje RNA jedro s kapsido. Vsaka strukturna beljakovina je zastopana v 60 kopijah, ki skupaj tvorijo ikozaedrično obliko kapside, z značilnim kanjonom

na mestu VP1, ki služi za pritrdjanje virusa na celične receptorje gostiteljskih celic (Jacobs in sod., 2013).

Zgradba genoma rinovirusov vrste C je zelo podobna rinovirusom vrste A in B, vendar ima določene spremembe. Znotraj regije VP2 se nahaja *cis* regulatorni element (angl. *cis-acting replication element, cre*), ki je potreben za virusno pomnoževanje in nadomešča cistein. Kot podaljšek regije VP4/VP2 se pojavlja edinstven vzorec Met₆₇ ali Ser₆₈. Znotraj regije VP1 in nekaterih drugih regij, se nahajajo specifične insercije in delecije, na koncu polimeraze 3D pa najdemo priključen izolevcin (Lau in sod., 2007).



Slika 2: Zgradba genoma HRV-C-15 (Bochkov in Gern, 201: 488).

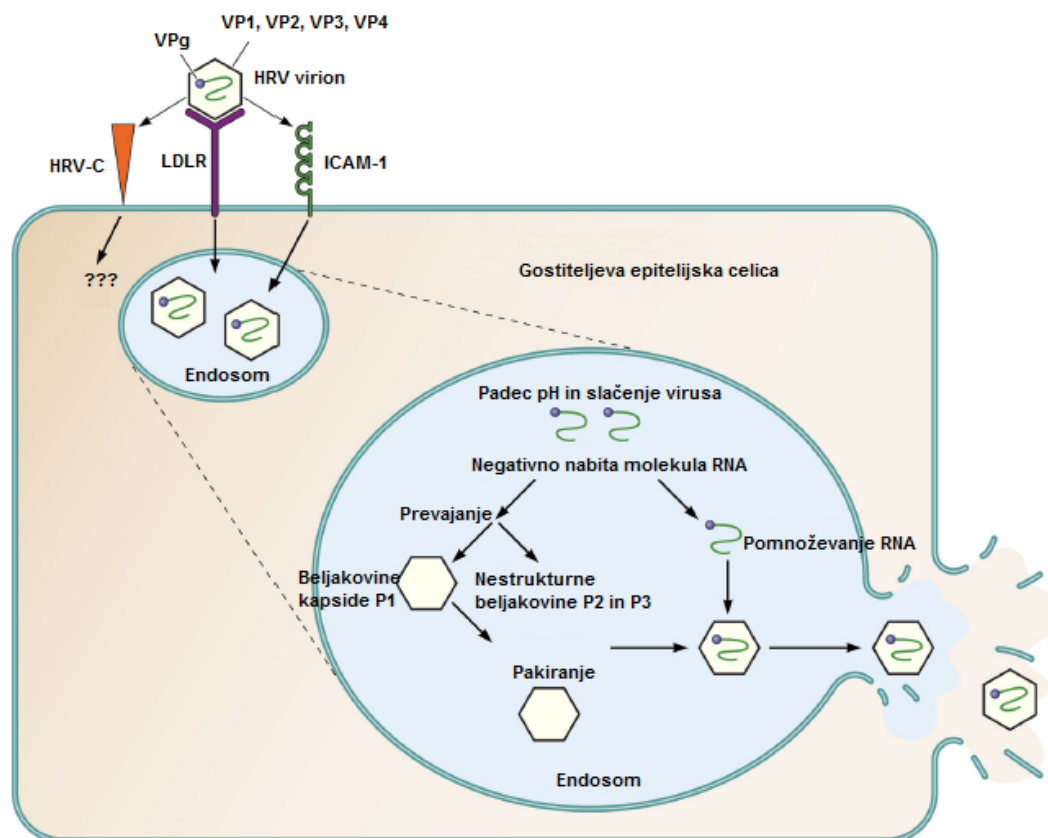
Večina rinovirusov vrste A in B za vezavo uporablja receptorske molekule ICAM-1. Ostali vstopijo v gostiteljske celice preko receptorjev LDLR (Fuchs in Blaas, 2010). Za manjše število sevov je značilna uporaba drugih receptorjev, najznačilnejši je heparan sulfat (HRV-54, 89, 8) (Bochkov in Gern, 2012).

Bioinformacijske primerjave nukleotidnih zaporedij poznanih rinovirusov vrste C kažejo na edinstven aminokislinski profil, ki se nahaja v receptorskih molekulah in se ne ujema z aminokislinskim zaporedjem dobro poznanih receptorjev ICAM-1 in LDLR. Na podlagi tega predvidevajo, da rinovirusi vrste C za vstop v gostiteljsko celico uporabljajo edinstvene receptorje, ki so značilni le za to skupino virusov (Bochkov in sod., 2011).

2.2.2 Pomnoževanje virusnega genoma

Virus vstopi v gostiteljsko celico na dva načina, in sicer z makropinocitozo ali z endocitozo, ki je od klaritina odvisna ali neodvisna. Znotraj endosoma sledi konformacijska sprememba, ki jo povzroči padec pH ali molekula ICAM-1. Sledi razgradnja virusne kapside, nato prosta RNA s pomočjo virusnih beljakovin v steni endosoma oblikuje poro ter ga zapusti. V citosolu gostiteljske celice poteče prevajanje v strukturne in nestrukturne beljakovine ter

podvojevanje negativno nabite RNA molekule, pri čemer sodelujejo gostiteljevi ribosomi. Podvojena virusna RNA se nato zbere v novo nastalih beljakovinah ter se z lizo izloči iz gostiteljske celice (Fuchs in Blaas, 2010).



Slika 3: Virusno pomnoževanje v epitelijskih celicah dihal pri človeku (Jacobs in sod., 2013: 138).

2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV

Prvo molekularno metodo, imenovano verižna reakcija s polimerazo (angl. *Polymerase chain reaction*, PCR), za odkrivanje rinovirusov v klinični vzorcih, so razvili leta 1989. Metode PCR omogočajo uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov, ki jih lahko uporabljamo za klasični PCR in novejša različica metode PCR, kot je verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo v realnem času (angl. *real-time reverse transcription polymerase chain reaction*, real-time RT-PCR). Univerzalni začetni nukleotidi nalegajo na visoko ohranjeno regijo 5' NCR. Na tak način so se izoblikovale visoko občutljive metode PCR, ki omogočajo odkrivanje vseh rinovirusov (Gama in sod., 1989).

2.3.1 Trenutne molekularne metode in genotipizacija HRV-C

Določanje nukleotidnega zaporedja, na podlagi relativno kratkega odseka 5' NCR (270-390 baznih parov), omogoča identifikacijo rinovirusov, čeprav znotraj te regije težko ločimo podtipse rinovirusov, predvsem zaradi domnevnih rekombinacij med sevi rinovirusov vrste A in C, znotraj te ohranjene regije. Zanimivo je odkritje rinovirusov vrste Ca (HRV-Ca). Gre za seve, ki jih na podlagi določanja nukleotidnega zaporedja regije 5' NCR lahko uvrstimo v skupino A in C. Dokončna klasifikacija rinovirusnih sevov je tako odvisna od določanja nukleotidnega zaporedja še dveh regij, VP2/VP4 in VP1. Ti dve regiji sta, v primerjavi z regijo 5' NCR, veliko bolj variabilni, kar pa ovira razvoj univerzalnih začetnih oligonukleotidov (Arden in Mackay, 2010).

Avstralski raziskovalci so dokazali povezavo med virusnim bremenom in dokazom prisotnosti virusa v vzorcu dihal. Testirali so 10 začetnih oligonukleotidov ter ugotovili, da v primeru nizkega virusnega bremena ne zaznajo prisotnosti virusne RNA, kar predstavlja velik problem pri epidemioloških raziskavah (Faux in sod., 2011).

Določanje nukleotidnega zaporedja pridelkov PCR je hitro, enostavno ter cenovno ugodno. Gre za učinkovit postopek tipizacije rinovirusov, ki se pogosto uporablja pri obširnih epidemioloških raziskavah. Molekularna tipizacija predstavlja zahtevnejšo metodo predvsem takrat, ko je v vzorcu prisotnih več različnih rinovirusov. Pravilno tipiziranje je pomembno predvsem kadar preučujemo povezavo med klinično sliko okužbe in vrsto rinovirusa. Z uporabo poznanih molekularnih metod lahko danes, z določanjem nukleotidnega zaporedja, uspešno tipiziramo več kot 90 % vzorcev, v katerih smo predhodno dokazali prisotnost rinovirusov (Huang in sod., 2009).

2.3.2 Genetska raznolikost in rekombinacije v evoluciji HRV-C

Rinovirusi so v primerjavi z ostalimi RNA virusi, genetsko zelo raznolika skupina. V zadnjih letih se je, z uporabo molekularnih metod, močno povečalo število rinovirusov vrste C. Ob tem se pojavlja vprašanje ali gre resnično za skupino novih virusov. Znotraj genoma rinovirusov se namreč pojavljajo deli, ki so bili in so še vedno podvrženi selektivnim pritiskom, kar vodi v mutacije virusnega genoma. Prisotne so v strukturnih (1B, 1C in 1D) in nestrukturnih (3C in 3D) delih genoma, kar povečuje verjetnost, da so že poznani sevi mutirali. Raziskave kažejo, da je med vsemi tremi skupinami rinovirusov, najbolj raznolika

vrsta C. Rekombinacije se pojavljajo tudi med določenimi rinovirusi vrste A in B, kar je privedlo do velike genetske raznolikosti znotraj teh dveh skupin (Bochkov in Gern, 2012).

Kitajski raziskovalci so s filogenetsko analizo dela regije 5' NCR in VP4/VP2 razvrstili 34 nukleotidnih zaporedij rinovirusov vrste C. Na podlagi analize regije VP4/VP2 so vseh 34 nukleotidnih zaporedij uvrstili v rinovirusno skupino C, saj so se od rinovirusov vrste A in B razlikovala v več kot 47 % nukleotidov. Na podlagi analize dela regije 5' NCR je bila večina nukleotidnih zaporedij (n=20) podobna nukleotidnim zaporedjem rinovirusov vrste A oz. Ca. Slednje predstavlja verjetnost rekombinacij znotraj iste vrste (A, B ali C). Preostalih 14 oligonukleotidnih zaporedij je predstavljalo edinstveno skupino HRV-Cc, ki se je razlikovala od ostalih skupin rinovirusov (Huang in sod., 2009). Nadaljnje raziskave, v katerih so analizirali genom rinovirusov vrste Ca, so potrdile obstoj variabilnega rekombinacijskega mesta znotraj regije 5' NCR, kar je prvič potrdilo možnost rekombinacij, ki vključujejo tudi rinovirusno skupino C.

Z analizo regije 5' NCR so uspešno odkrili 175 rinovirusov vrste C ter jih na podlagi analize nukleotidnega zaporedja regije VP4/VP2 razdelili v dve skupini, in sicer rinoviruse vrste Ca (n=96) in rinoviruse vrste Cc (n=79). Filogenetska drevesa rinovirusne skupine Ca, narejena na podlagi regij 5' NCR in VP4/VP2, sta skladna z domnevnimi medvrstnimi rekombinacijami, ki so potekale tekom evolucije. Na podlagi dosedanjih raziskav niso potrdili značilnih razlik med kliničnimi pojavi ali epidemiologijo rinovirusov vrste Ca in Cc (Bochkov and Gern, 2012).

2.4 EPIDEMIOLOGIJA

Rinovirusi povzročajo okužbe dihal po vsem svetu in skozi celo leto. Epidemiološke raziskave potekajo vse od leta 1960. Na podlagi teh se je oblikovala epidemiološka slika, ki kaže na najvišjo pogostnost pojavljanja rinovirusov v začetku jeseni in nižjo pogostnost pojavljanja spomladi (Jacobs in sod., 2013). Novejše, prospektivne raziskave, ki temeljijo na uporabi molekularnih metod so te domneve potrdile (Vesa in sod., 2001). Rinovirusi se pojavljajo v vseh mesecih v zmerno toplem, tropskem in subtropskem podnebju ter polsuhem podnebju. Rinovirusi vrste C se pojavljajo sezonsko, v zmerno-toplem in subtropskem podnebju z vrhom okužb jeseni in pozimi, medtem, ko so v tropih vezani na deževno obdobje. Podobno pojavnost kažejo rinovirusi vrste A in B (Lau in sod., 2010).

Za boljše razumevanje sezonskega pojava rinovirusov so potrebne daljše in večje epidemiološke raziskave, s simptomatskimi in asimptomatskimi udeleženci (Jacobs in sod., 2013).

2.5 PATOGENEZA

2.5.1 Zgornja dihal

V želji po razumevanju kako rinovirusi okužijo celice nosne sluznice, so Winther in sodelavci (1986) izbrali naključne prostovoljce ter jim v očesno veznico ali nosni del žrela inokulirali 25 µl virusne raztopine. Razvoj okužbe so spremljali dnevno, in sicer z inokulacijo odvzetih vzorcev nosnega dela prostovoljcev, na celično kulturo primarnih človeških bronhialnih epitelijskih celic (angl. *primary human bronchial epithelial cells*, HBECS). Na podlagi rezultatov so zaključili, da se virus hitro po inokulaciji razširi v obe nosni votlini ter ostaja koloniziran na epitelijskih celicah nosa in v nosnem delu žrela (Winther in sod., 1986). Z uporabo *in situ* hibridizacije so potrdili pomnoževanje rinovirusov v nizkem deležu epitelijskih celic nosa in nosnem delu žrela (Arruda in sod., 1995), najverjetneje zaradi omejenega izražanja molekul ICAM-1 (Winther in sod., 1997).

Virus influence (angl. *influenza virus*, Flu) in respiratorni sincicijski virus (angl. *respiratory syncytial virus*, RSV) povzročata uničenje epitelijskih celic zgornjih dihal, rinovirusi pa le redko. Z uporabo svetlobne in elektronske mikroskopije so Winther in sodelavci (1997) ugotovili, da ostanejo epitelijske celice v nosni votlini, pri osebah s prehladom strukturno nedotaknjene (Winther in sod., 1997). Rinovirusi s svojo prisotnostjo oslabijo celično membrano epitelijskih celic ter tako zmotijo delovanje submembranskih beljakovin, ki vzdržujejo tesne medcelične stike in onemogočajo vdor bakterij (Jacobs in sod., 2013).

Rinovirusi vrste A in B najpogosteje povzročajo obolenja zgornjih dihal, kar pa ne moremo trditi za rinoviruse vrste C. Z *in situ* hibridizacijo so potrdili šibko rast v migetalčnih in nemigetalčnih celicah (Bochkov in sod., 2011).

2.5.2 Spodnja dihal

Okužbe spodnjih dihal, ki jih povzročajo rinovirusi, imajo velik vpliv na poslabšanje astme, pojav bronhitisa, bronhiolitisa, cistične fibroze in pljučnice (Busse in sod., 1997). Angleški

raziskovalci so želeli potrditi pomembnost patogeneze rinovirusov pri človeku, saj lahko okužijo zgornja in spodnja dihal. Vstop virusa v spodnja dihal ter nadaljnje pomnoževanje virusa v epitelijskih celicah, so dokazali tako pri astmatikih kot pri zdravih posameznikih. Pomnoževanje rinovirusov v spodnjih dihalih so potrdili *in vivo* z *in situ* hibridizacijo ter *in vitro* s časovno odvisnim povečevanjem količine virusa ter z dokazovanjem virusne RNA in sintezo novih virusnih beljakovin (Papadopoulos in sod., 2000).

Rinovirusi pri okužbi spodnjih dihal najpogosteje okužijo epitelijske celice bronhijev. Ugotovili so, da v *in vitro* pogojih količina virusa v epitelni celici bronhijev znatno naraste po 24–48 urah (Winther in sod., 1990).

Papadopoulos in sodelavci (2000) so predpostavili, da je razvoj okužbe spodnjih dihal odvisen od količine virusa v zgornjih dihalih. Dokazali so namreč, da se je okužba spodnjih dihal pojavila pri tistih posameznikih, ki so imeli v epitelijskih celicah nosu visoko virusno breme, vendar so za potrditev te domneve potrebne nadaljnje raziskave. Širjenje virusa iz zgornjih v spodnja dihal je pogojeno z dihanjem, kašljanjem in kihanjem ter z vdihavanjem okuženega aerosola, ki potuje neposredno v spodnji del dihal. Preučevali so tudi pojav citopatskega efekta (CPE) v epitelni celici bronhijev. Ugotovili so, da rinovirusi povzročajo CPE na celični kulturi primarnih človeških bronhialnih epitelijskih celic le v primeru, ko je količina virusa zelo visoka in ko epitelijske celice ne rastejo konfluentno. Rezultati kažejo, da rinovirusi v primerjavi z ostalimi virusi, ki povzročajo okužbe dihal v gostiteljskih celicah ne povzročajo pomembnih CPE (Papadopoulos in sod., 2000).

2.6 KLINIČNA SLIKA

2.6.1 Okužbe spodnjih in zgornjih dihal

Rinovirusi najpogosteje povzročajo okužbe zgornjih dihal v obliki prehlada, akutnega vnetja srednjega ušesa in vnetja sinusov (Singleton in sod., 2010). Inkubacijska doba prehlada, ki ga povzročajo rinovirusi traja 2 dni, simptomi pa so prisotni od 7 do 14 dni (Pappas in sod., 2008). Kot glavne simptome in znake se omenja nosni izcedek, zamašen nos, vneto žrelo, kašelj, glavobol, občasna povišana telesna temperatura in splošno slabo počutje. Tako molekularne kot klasične metode, s katerimi dokazujemo prisotnost rinovirusov, opredeljujejo rinoviruse kot najpogostejše povzročitelje prehlada (Arruda in sod., 1997). Zelo pogost simptom, ki spremlja rinovirusna prehladna obolenja je vnetje sinusov. Glavni vzrok za

širjenje rinovirusov v sinuse je odstranjevanje nosnega izcedka, ki je prav tako eden izmed najpogostejših simptomov (Gwaltney in sod., 2000).

Med okužbe spodnjih dihal uvrščamo krup (laringotraheobronhitis), bronhiolitis in pljučnico. Pri majhnih otrocih rinovirusi najpogosteje povzročajo bronhiolitis, kar jih uvršča med druge najpogostejše povzročitelje bronhiolitisa pri otrocih, takoj za respiratornim sincicijskim virusom (Jacobs in sod., 2013). Raziskave potrjujejo, da bronhiolitis v zgodnjem otroštvu, poveča tveganje za kasnejši razvoj astme in piskanja (Midulla in sod., 2012).

2.6.2 Kronične pljučne bolezni

V zgodnjem otroštvu se bronhiolitis in akutna astma, ki ju povzročajo rinovirusi, izražata s podobnimi kliničnimi znaki, med katerimi so najpogostejši piskanje, hitro dihanje, vnetje dihalnih poti in dihalna stiska. Raziskave navajajo vzročno povezavo med akutnim piskanjem in astmo, saj se pri tretjini dojenčkov z akutnim piskanjem, le-to razvije v ponavljajoče se piskanje in naprej v astmo. Tako so raziskovalci oblikovali 3 različne hipoteze. Prva hipoteza zagovarja razvoj akutnega piskanja v kronično piskanje in naprej v astmo, saj se pljuča in imunski sistem razvijajo skupaj z otrokom in so v tem obdobju še posebej občutljiva. Druga hipoteza predpostavlja verjetnost, da ta povezava ni vzročna in virus povzroči le napredovanje akutnega piskanja v kroničnega, ki ne napreduje v astmo. Tretja hipoteza pa vsebuje elemente prve in druge hipoteze. Imenujemo jo hipoteza dveh udarcev (angl. *two-hit hypothesis*), po kateri naj bi virusna okužba napredovala v astmo samo pri otrocih z večjim tveganjem (Gern in sod., 2005). Tveganje za razvoj astme pri otrocih je pogojeno tudi z njihovim fizičnim razvojem, posebej v zgodnjem otroštvu ter z družinsko zgodovino alergijskih bolezni (Gern, 2010).

Zdravniki so z razvojem molekularnih metod potrdili domnevo, da okužbe dihal pri otrocih z že postavljeno diagnozo astme, povzročijo njeno poslabšanje. Ob tem so kot glavne povzročitelje navedli rinoviruse, saj so povzročili kar dve tretjini poslabšanja astme. Poslabšanje astme pa ni odvisno od števila prehladnih obolenj ali njihove resnosti, prav tako ne od časovnega trajanja simptomov okužbe zgornjih dihal. Ugotavljajo namreč, da poslabšanje astme pogojujejo okužbe spodnjih dihal (Corne in sod., 2002).

2.6.3 Okužbe, ki jih povzročajo rinovirusi vrste C

V številnih raziskavah so potrdili prisotnost rinovirusov vrste C v spodnjih dihalih, vendar je njihov patogenetski mehanizem še neznan. Rinoviruse vrste C so raziskovalci osamili iz vzorcev spodnjih dihal majhnih otrok z bronhiolitisom ter iz vzorcev dihal otrok sprejetih v bolnišnico zaradi akutne okužbe dihal, ki je posledica poslabšanja astme ali močnega piskanja (Lau in sod., 2007). Klinične raziskave kažejo, da se pri otrocih z astmo pogosteje pojavljajo rinovirusi vrste C, kot rinovirusi vrste A (Miller in sod., 2009a) ter da je piskanje pogostejše pri bolnikih, pri katerih dokažemo rinoviruse vrste C in A, v primerjavi z bolniki pri katerih dokažemo rinoviruse vrste B (Khetsuriani in sod., 2008).

Rinovirusi vrste C se najpogosteje pojavljajo pri otrocih z okužbami spodnjih dihal, in se kažejo kot bronhitis, bronhiolitis ali pljučnice, kar jih opredeljuje kot glavne povzročitelje okužb dihal s težkim potekom (Lau in sod., 2007; Huang in sod., 2009). Rinovirusi vrste C so prav tako pomembni povzročitelji akutnega vnetja srednjega ušesa in sinusitisa. Slednje potrjuje finska raziskava, kjer so raziskovalci uspešno osamili rinoviruse vrste C iz tekočine srednjega ušesa pri majhnih otrocih z diagnozo vnetja srednjega ušesa (Savolainen-Kopra in sod., 2009).

Rinovirusne okužbe pri odraslih so slabše raziskane, saj je delež hospitaliziranih oseb zaradi virusne okužbe dihal v tej populaciji nižji, prav tako vzorčenje poteka zelo redko in pogosto niso na voljo klinični podatki. Raziskave pri odraslih kažejo, da se rinovirusi vrste C najpogosteje pojavljajo v povezavi s poslabšanjem kroničnih pljučnih obolenj, astmo ter okužbami spodnjih in zgornjih dihal (Lau in sod., 2010). Leta 2009 so v raziskavi, ki je zajela le odrasle bolnike, prikazali pomen rinovirusov vrste C pri starejših bolnikih z okužbami dihal. Ugotovili so, da pri bolnikih, pri katerih so dokazali prisotnost rinovirusov vrste C, prevladuje pljučnica. (Lau in sod., 2009).

2.7 ZDRAVLJENJE

Raziskovalcem je uspelo razviti zdravila s katerimi delujejo na kapsido rinovirusov in s tem preprečijo nadaljnje slačenje virusa. Tako so izboljšali učinkovitost zdravljenja, ki je bilo do sedaj le podporno. Zaviralci virusnega pomnoževanja se vežejo na hidrofobne dele kapside, s čimer sprožijo konformacijsko spremembo, kar poveča stabilnost virusa in omogoči vezavo zaviralcev na virusne receptorje. Najučinkovitejše je kombinirano zdravljenje z uporabo

zdravil z različnim mehanizmom delovanja, saj se le tako izognemo možnemu pojavu virusne odpornosti. Najpogosteje se za zdravljenje uporabljajo tri različna zdravila, in sicer pleconavir, vapendavir in pirodavir (Jacobs in sod., 2013).

V uporabi so še zdravila, ki delujejo kot zaviralci proteolitičnih virusnih encimov. Rupintrivir prepreči delovanje 3C proteaze, ki je ključna za virusno pomnoževanje in omogoči sestavljanje novih virusov. Interferoni imajo protivirusni in imunološki učinek, prav tako preprečujejo virusno pomnoževanje in vplivajo na zmanjšano celično dovzetnost za virusno okužbo (Anzueto, 2003). Za zdravljenje se kot domače zdravilo uporablja ameriški slamnik (*Echinacea* spp.), ki je hkrati najpogosteje uporabljeno zeliščno zdravilo v medicini. Uporabno je predvsem zaradi dobrega vpliva na zdravje ljudi, saj z elementi kot so alkilamidi, polisaharidi in derivati kafeinske kisline stimulira makrofage, monocite in naravne celice ubijalke (Barret, 2003). Prav tako učinkovita je uporaba cinka, čeprav mehanizem delovanja ni dobro poznan. Cink zavira virusno pomnoževanje, preprečuje vezavo rinovirusov na receptorske molekule ICAM-1, spremeni konfiguracijo virusnih beljakovin ter tako prepreči proteolizo in sestavljanje na novo nastalih virusnih delcev (Novick in sod., 1996).

2.7.1 Preventiva

Rinovirusi se najpogosteje prenašajo iz človeka na človeka preko manjših in večjih aerosolnih kapljic ali z neposrednim kontaktom. Širjenje okužb dihal lahko preprečimo s primernim obnašanjem v bližini bolne osebe, kjer upoštevamo primerno razdaljo, z zaščitnimi maskami ali redno higieno rok (Jacobs in sod., 2013).

Cepivo proti okužbam, ki jih povzročajo rinovirusi, še ni razvito. Njegov razvoj upočasnjuje več kot 100 različnih rinovirusnih serotipov in premajhne epidemiološke raziskave, na podlagi katerih bi lahko ugotovili kateri rinovirusni serotipi najpogosteje povzročajo okužbe pri ljudeh. Še vedno ne poznamo dobro antigenskih razlik med rinovirusi vrste C in serotipi rinovirusov vrste A in B (Rohde, 2011). Sedanje raziskave temeljijo na antigenskem peptidu, ki je del beljakovine VP1. Ta ima glavno vlogo pri vezavi receptorjev na epitelne celice gostitelja in ga prepoznajo nevtralizacijska protitelesa usmerjena proti rinovirusom (Jacobs in sod., 2013).

2.8 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

2.8.1 Vzorčenje

Klinične vzorce, za laboratorijsko dokazovanje prisotnosti rinovirusov, je potrebno odvzeti v najkrajšem možnem času od pojava prvih simptomov, saj je količina rinovirusov najvišja v prvih dveh dneh okužbe. Za dokazovanje okužb zgornjih dihal, uporabljamo brise ali aspirate nosnega dela žrela, ki jih vstavimo v virusno transportno gojišče. Dober vir virusov je tudi izpirek nosne votline (Hernes in sod., 2011). Za dokazovanje okužb spodnjih dihal se uporabljajo aspirati traheje in bronhijev ter bronhoalveolarni izpirek, zelo redko se opravi biopsija pljuč (Harvala in sod., 2012).

2.8.2 Celične kulture

Virusne kulture v rutinski diagnostiki niso pogoste, saj jih nadomeščajo visoko občutljive molekularne metode. Uporabljajo se za preučevanje značilnosti in patogeneze virusov. Za kultivacijo rinovirusov se najpogosteje uporabljajo celične linije človeških pljučnih epitelijskih celic, HeLa celice ter človeške embrionalne ledvične celice. HeLa celice so zelo dober model za preučevanje sinteze RNA, translacije, sinteze beljakovin in virusne patogeneze. Celične kulture se goji pri temperaturi 33 °C ter pri nevtralnem pH, saj so rinovirusi občutljivi na kislo okolje (Amineva in sod., 2011).

2.8.3 Molekularne metode

Za odkrivanje rinovirusov se najpogosteje uporabljata klasični RT-PCR in RT-PCR v realnem času, ki sta se uvedla v diagnostiko rinovirusov po letu 1980. PCR metode so skrajšale čas diagnoze iz dveh tednov na nekaj dni. Večina metod PCR omogoča odkrivanje rinovirusov na podlagi visoko ohranjene regije 5' NCR, ki se pojavlja pri vseh rinovirusih in enterovirusih (EV). Med posameznimi virusnimi sevi se pogosto pojavlja navzkrižna reaktivnost, ki otežuje njihovo razlikovanje. Razlikovanje med rinovirusi in enterovirusi je mogoče na podlagi velikosti pomnoženih pridelkov PCR, ki jih zaznamo z metodo RFLP (angl. *restriction fragment length polymorphism*) ali z uporabo RT-PCR v realnem času (Jacobs in sod., 2013). Nekateri raziskovalci navajajo uporabo kvantitativnega RT-PCR v realnem času (angl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR), ki omogoča določanje virusnega bremena, vendar trenutno ni na voljo komercialno dostopen kvantitativen PCR test, s katerim bi lahko določili vse tipe rinovirusov (Schiebler in sod., 2012).

2.8.4 Tipiziranje

Razvoj molekularnih metod je omogočil tipizacijo rinovirusnega genoma, na podlagi katerega so rinoviruse razvrstili v tri skupine; A, B in C. Tipizacija temelji na pomnoževanju in analizi nukleotidnega zaporedja VP1 ali VP4 virusnih genov. Pri analizi regije VP4 na zelo hiter in enostaven način uvrstimo rinoviruse v skupino A, B ali C, medtem ko analiza regije VP1 uspešno loči med rinovirusnimi tipi znotraj iste skupine. Nukleotidno zaporedje lahko določamo tudi na podlagi regij 3D in 5' NCR, vendar ne glede na to kateri del rinovirusnega genoma analiziramo, z isto metodo ne moremo razvrstiti viruse v skupino ter jih hkrati ločiti znotraj iste skupine (Jacobs in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI IN VZORCI

V raziskavo o molekularni epidemiologiji rinovirusov, smo vključili pediatrične bolnike iz raziskave Virusne Okužbe Dihal in Prebavil (VODP), ki je v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011 potekala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Raziskava je potekala v sodelovanju s Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja ter Pediatrično kliniko, Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, Univerzitetnega Kliničnega Centra, Ljubljana. V prvotno VODP raziskavo je bilo vključenih 320 pediatričnih bolnikov, ki so bili na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja sprejeti zaradi akutnega bronhiolitisa. Vsi pediatrični bolniki so bili mlajši od 6 let. Vključeni so bili le otroci katerih starši so po obrazložitvi pisno podali soglasje k sodelovanju v raziskavi. Pediatrični bolniki so bili pregledani ob vključitvi v raziskavo. Za dokaz prisotnosti virusov, ki povzročajo okužbe dihal, jim je bil odvzet bris nosnega dela žrela. Vsi vzorci pediatričnih bolnikov so bili pregledani na prisotnost nukleinskih kislin respiratornega sincicijskega virusa (RSV), človeškega metapneumovirusa (hMPV), virusov influence A in B (Inf A/B), rinovirusov (HRV), človeških koronavirusov (HCoV), človeškega bokavirusa 1 (HBoV), virusov parainfluence 1, 2 in 3 (PIV 1-3) in adenovirusov (AdV). V našo raziskavo o molekularni epidemiologiji rinovirusov je bilo vključenih le 85 vzorcev otrok z akutnim bronhiolitisom, pri katerih smo v brisu nosnega dela žrela z metodo RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost rinovirusov.

V raziskavo o molekularni epidemiologiji rinovirusov pri otrocih smo vključili tudi 21 od 73 vzorcev pediatričnih bolnikov, ki so bili v istem obdobju, kot je potekala raziskava VODP, zaradi zapletov ob okužbi spodnjih dihal sprejeti na Pediatrično kliniko, Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo z diagnozo težke okužbe spodnjih dihal. Vsi vzorci bolnikov so bili pregledani na prisotnost nukleinskih kislin respiratornega sincicijskega virusa (RSV), človeškega metapneumovirusa (hMPV), virusov influence A in B (Inf A/B), rinovirusov (HRV), človeških koronavirusov (HCoV), človeškega bokavirusa 1 (HBoV), virusov parainfluence 1, 2 in 3 (PIV 1-3) in adenovirusov (AdV). Z metodo RT-PCR v realnem času smo prisotnost nukleinskih kislin rinovirusov dokazali v 21 vzorcih pediatričnih bolnikov s težko klinično sliko okužbe spodnjih dihal.

V našo raziskavo smo vključili tudi kontrolno skupino, v katero smo uvrstili 17 vzorcev dihal otrok od skupno 156 otrok iz raziskave VODP, v katerih smo z metodo RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost rinovirusov. Otroci so bili v istem obdobju kot je potekala raziskava VODP sprejeti na Pediatrično kliniko, Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, zaradi elektivnega kirurškega posega. Kontrolno skupino so sestavljali zdravi otroci do dopolnjenega 6 leta starosti. Otroci so bili vključeni v raziskavo VODP, v kolikor so starši po obrazložitvi podali pisno soglasje k sodelovanju in izpolnili vprašalnik o morebitnih bolezenskih znakih pri otroku. Otroku je bil odvzet bris nosnega dela žrela, ko je bil otrok že uspavan zaradi operativnega posega. Ob odpustu otroka iz bolnišnice so starši dobili vprašalnik o morebitnih bolezenskih znakih pri otroku po odpustu. Vsi vzorci zdravih otrok iz kontrolne skupine so bili pregledani na prisotnost nukleinskih kislin respiratornega sincicijskega virusa (RSV), človeškega metapnevmonovirusa (hMPV), virusov influence A in B (Inf A/B), rinovirusov (HRV), človeških koronavirusov (HCoV), človeškega bokavirusa 1 (HBoV), virusov parainfluence 1, 2 in 3 (PIV 1-3) in adenovirusov (AdV).

3.2 METODE DELA

Vsi vzorci vključeni v raziskavo, ki je potekala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, so bili brisi nosnega dela žrela, hranjeni v transportnem gojišču za virusne povzročitelje okužb dihal. Iz vseh vzorcev smo z avtomatsko metodo na inštrumentu MagNA Pure Compact (Roche, Mannheim, Nemčija) osamili celokupne nukleinske kisline. Celokupne nukleinske kisline smo do uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.1 Osamitev celokupne nukleinske kisline

Osamitev celokupnih nukleinskih kislin smo izvedli s komercialnim kompletom MagNA Pure Compact Nucleid Acid Isolation kit I (Roche, Mannheim, Nemčija), na inštrumentu MagNA Pure Compact (Roche, Mannheim, Nemčija).

Komercialni komplet MagNA Pure Compact Nucleid Acid Isolation kit I vsebuje naslednje komponente:

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

- elucijske epruvete,
- pokrovčke za elucijske epruvete.

Za osamitev celokupnih nukleinskih kislin, smo uporabili 190 µl vzorca, 5 µl RNA interne kontrole EAV (angl. *equine arteritis virus*) in 5 µl DNA interne kontrole EHV1 (angl. *equine herpesvirus type 1*). Uporabimo ju kot kontroli uspešnosti osamitve celokupnih nukleinskih kislin ter uspešnosti metode PCR. Iz 200 µl tako pripravljenega vzorca nato avtomatsko osamimo celokupne nukleinske kisline, s končnim elucijskim volumnom 100 µl, po navodilih proizvajalca (Roche, mannheim, Nemčija). Celokupne nukleinske kisline shranimo pri –20 °C do uporabe.

3.2.2 Pomnoževanje virusne nukleinske kisline

3.2.2.1 Teoretične osnove – verižna reakcija s polimerazo in predhodno reverzno transkripcijo

Verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) uvrščamo med najobčutljivejše in najpogosteje uporabljene molekularne metode v molekularni mikrobiologiji, ki je v zelo kratkem času revolucionarno spremenila način odkrivanja virusnih in bakterijskih povzročiteljev okužb (Poljak in sod., 1994). Metode PCR omogočajo pomnoževanje nukleinskih kislin *in vitro* v zelo kratkem času, v katerem lahko eksponentno namnožimo določeni manjši odsek deoksiribonukleinske kisline (angl. *deoxyribonucleid acid*, DNA) ali ribonukleinske kisline (angl. *ribonucleic acid*, RNA) (Seme in Poljak, 1996). Pomnoževanje poteka s pomočjo encima termostabilne polimeraze DNA. Določeni odsek tarčne DNA ali RNA je v nekaj urah mogoče pomnožiti več kot milijonkrat. Tako dobimo zadostno količino nukleinske kisline, ki omogoča nadaljnje molekularne analize, z namenom dokončne potrditve specifičnosti pomnoženega genskega odseka (Poljak in sod., 1994). Danes uporabljamo PCR v diagnostični mikrobiologiji predvsem za dokazovanje prisotnosti mikroorganizmov v kliničnih vzorcih (Poljak in sod., 1994). Omogoča molekularne raziskave akutnih in vztrajajočih virusnih okužb (Clementi in sod., 1993).

Za potek PCR reakcije potrebujemo par začetnih oligonukleotidov, ki se vežeta na oba konca ločene dvoverižne DNA. Vezana začetna oligonukleotida delujeta kot substrat za encim polimerazo. Pogosto se uporablja polimeraza *Taq* iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. PCR obsega tri stopnje (Niubo in sod., 1994):

- denaturacija DNA, ki poteka pri temperaturi 90-95 °C; v tem koraku se dvovijačna DNA loči v dve enovijačni verigi DNA,
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50-75 °C,
- podaljševanje DNA verige pri 72-78 °C, kjer polimeraza DNA v smeri 5' proti 3' sintetizira komplementarno verigo.

Te tri stopnje predstavljajo en temperaturni cikel PCR, ki se ponovi 25 do 40-krat. Z vsakim ciklom eksponentno število kopij tarčnega zaporedja narašča. Kadar pomnožujemo zaporedje RNA, poteče dodaten temperaturni cikel, kjer encim reverzna transkriptaza prepiše molekulo RNA v komplementarno zaporedje DNA (angl. *complementary DNA*, cDNA) (Singleton in Sainsbury, 2001).

V diagnostičnih laboratorijih se vse pogosteje uporablja PCR v realnem času. Ta metoda zmanjša možnost kontaminacije, saj po končani reakciji pridelke PCR reakcije zavržemo. Metoda PCR v realnem času je v osnovi hitrejša in občutljivejša ter omogoča sprotno sledenje količini nastalih produktov v vsakem ciklu pomnoževanja, kar omogočijo fluorescentne oligonukleotidne sonde (Mackay, 2004). Metoda PCR v realnem času je tako izboljšala zamudno prepoznavanje pridelkov PCR, ki ga poznamo pri klasičnem PCR in ne temelji na uporabi gelske elektroforeze (Valasek in Repa, 2005).

Poznamo različne vrste oligonukleotidnih sond, med katerimi se najpogosteje uporabljajo TaqMan ali 5' nukleazne sonde. Njihovo delovanje temelji na 5' proti 3' endonukleazni aktivnosti polimeraze DNA (Mackay in sod., 2002). TaqMan sonda ima na 5' konec vezano fluorescenčno barvilo, ki ga imenujemo poročevalec, na 3' koncu pa je vezan dušilec, ki je lahko fluorescirajoč ali nefluorescirajoč. Sonda se veže na komplementarno verigo DNA med oba začetna oligonukleotida. Sledi vezava polimeraze *Taq*, ki podaljša verigo ter s 5' – 3' eksonukleazno aktivnostjo cepi vezano sondo. Posledično poročevalec in dušilec nista več povezana, kar prekine prestrezanje fluorescence s strani dušilca. Intenziteta fluorescence je sorazmerna s količino pridelka PCR (Mackay, 2004).

Jakost fluorescence spremljamo z računalniškim programom, kjer opazujemo nastajanje sigmoidne krivulje, ki predstavlja količino nastalega pridelka PCR. Ta nastaja v odvisnosti od števila ciklov reakcije PCR. V prvi fazi pomnoževanja pridelkov ne vidimo, saj je jakost

signala pod detekcijskim pragom merilne naprave. Ko signal preseže detekcijski prag, začne eksponentno naraščati. To točko imenujemo C_t (angl. *threshold cycle*). Vrednost C_t nam poda količino pridelka ter je obratno sorazmerna začetni vrednosti tarčne DNA. Po določenem času se pomnoževanje tarčnega zaporedja upočasni, saj je sama reakcija omejena s količino reagentov. V tej fazi fluorescenca ne narašča več, temu sledi še zadnja faza, ki jo imenujemo plato (Mackay in sod., 2002).

3.2.2.2 Pomnoževanje tarčnega odseka HRV z RT-PCR v realnem času

Z RT-PCR v realnem času smo pomnoževali 142 baznih parov dolgo zaporedje visoko ohranjenega zaporedja pikornavirusov, ki ga imenujemo 5' nekodirajoča regija (angl. 5' *noncoding region*, 5' NCR) in je v celoti dolgo 390 baznih parov. Molekularno določanje rinovirusov na podlagi 5' NCR in nadaljnja analiza nukleotidnega zaporedja, predstavljata relativno preprosto in hitro metodo za določanje rinovirusnih genotipov.

Za dokaz nukleinskih kislin rinovirusov z metodo RT-PCR v realnem času smo uporabili že opisane začetne oligonukleotide in sondo (Preglednica 1) iz literature (Scheltinga in sod., 2005) ter komercialni komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen™, Grand Island, New York, ZDA), po navodilih proizvajalca.

Preglednica 1: Prikaz začetnih oligonukleotidov in oligonukleotidne sonde, ki so bili uporabljeni pri RT-PCR v realnem času, za dokaz rinovirusov. F - pozitivno usmerjeni začetni oligonukleotidi (angl. *forward primer*), P - sonda (angl. *probe*), R - negativno usmerjeni začetni oligonukleotidi (angl. *reverse primer*), HRV - rinovirus, FAM - reporterski fluorogen (karboksi-fluorescein), BBQ - zaviralni fluorogen (angl. *black berryquencher*).

Oznaka začetnega oligonukleotida	Oligonukleotidno zaporedje	Mesto prileganja	Tarčni gen	Dolžina tarčnega gena	Vir
235 HRV 1s	F: 5'-GAC ARG GTG TGA AGS YS-3'	409-425	5' NCR	142	Scheltinga in sod., 2005
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 CTAA-BHQ-1	451-470			

Končni volumen PCR reakcijske mešanice je bil 20 μl , od tega 5 μl nukleinskih kislin. Reagenti, ki smo jih uporabili v reakcijski mešanici za RT-PCR v realnem času so prikazani v preglednici 2. Končna koncentracija posameznih začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici je bila 400 nM, končna koncentracija sonde pa 340 nM. V vsako reakcijo smo vključili tudi negativno in pozitivno kontrolo. Kot negativno kontrolo smo uporabili demineralizirano destilirano vodo (ddH_2O), kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili vzorec, pri katerem smo že predhodno dokazali prisotnost rinovirusa.

Preglednica 2: Reakcijska mešanica za RT-PCR v realnem času za dokazovanje prisotnosti rinovirusov. HRV - rinovirus.

Reagenti	Volumen
Začetni oligonukleotid 235 HRV 1s (50 μM)	0,16 μl
Začetni oligonukleotid 235 HRV 2s (50 μM)	0,16 μl
Začetni oligonukleotid 236 HRV as (50 μM)	0,16 μl
Oligonukleotidna sonda 522 HRV-TQ-FAM (50 μM)	0,136 μl
2x RT-PCR pufer	10 μl
MgSO_4 (5 mM)	0,6 μl
Encim reverzna transkriptaza	0,4 μl
ROX barvilo	0,4 μl
Voda, prosta nukleaze	2,984 μl

PCR reakcija je potekala pod specifičnimi pogoji (Preglednica 3) v inštrumentu StepOne™ (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA), po navodilih proizvajalca. Potek PCR reakcije smo lahko spremljali preko računalnika. Po končani reakciji smo odčitali rezultate ter jih analizirali.

Preglednica 3: Prikaz stopenj reakcije RT-PCR v realnem času za dokaz prisotnosti HRV. HRV - rinovirus.

Proces	Čas	Temperatura	Število ciklov
Reverzna transkripcija	20 minut	50 °C	1
Prekinitev delovanje reverzne transkriptaze in aktivacija TaqDNA-polimeraze	2 minuti	95 °C	1

Denaturacija dvovijačne cDNA	15 sekund	95 °C	45
Prileganje začetnih nukleotidov	45 sekund	60 °C	45
Podaljševanje verige	45 sekund	60 °C	45

3.2.2.3 Pomnoževanje tarčnega odseka HRV s klasičnim PCR

Tarčni odsek HRV smo pomnožili tudi s klasičnim PCR, in sicer pomnožili smo 390 baznih parov 5' nekodirajoče regije (angl. 5' *noncoding region*, 5' NCR). Ta korak je potreben za nadaljnje določanje nukleotidnega zaporedja genskih odsekov rinovirusov v vzorcih. Tarčne odseke smo pomnožili v inštrumentu Eppendorf Mastercycler® gradient S (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) ter jih kasneje dokazali z agarozno gelsko elektroforezo.

Za klasični RT-PCR za dokaz nukleinskih kislin rinovirusov smo uporabili že opisane začetne oligonukleotide (Kiang in sod., 2008) in uporabili reagente iz komercialno dostopnega kompleta SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™, Grand Island, New York, ZDA), ki so navedeni v preglednici 4.

Koncentracija začetnih oligonukleotidov v PCR reakciji s končnim volumnom 50 µl je bila 200 nM, od tega je bilo v reakcijski mešanici 5 µl nukleinskih kislin.

Preglednica 4: Reakcijska mešanica za klasični PCR za dokaz prisotnosti HRV. HRV - rinovirus.

Reagenti	Volumen
2x reakcijska mešanica	25 µl
Začetni oligonukleotid DK001 (10 µM) 5'-CACGGACACCCAAAGTAGT-3'	1 µl
Začetni oligonukleotid DK004 (10 µM) 3'-TGATGAAACCCACAGGCAC-5'	1 µl
SuperScript® III RT/Platinum® <i>Taq</i> mešanica	2 µl
Voda, prosta nukleaz	15 µl

V vsako PCR reakcijo smo vključili tudi negativno in pozitivno kontrolo. Kot negativno kontrolo smo uporabili demineralizirano destilirano vodo (ddH₂O), kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili vzorec, pri katerem smo že predhodno dokazali prisotnost rinovirusa. RT-PCR reakcija je potekala pod pogoji, ki so navedeni v preglednici 5.

Preglednica 5: Prikaz poteka klasične reakcije RT-PCR za dokaz prisotnosti HRV. HRV - rinovirus.

Proces	Čas	Temperatura	Število ciklov
Reverzna transkripcija	30 minut	50 °C	1
Prekinitev delovanje reverzne transkriptaze in aktivacija TaqDNA-polimeraze	2 minuti	94 °C	1
Denaturacija ds cDNA	15 sekund	94 °C	40
Prileganje začetnih nukleotidov	30 sekund	55 °C	40
Podaljševanje verige	1 minuta	72 °C	40
Inkubacija	10 minut	72 °C	1

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Pridelke, ki smo jih pomnožili s klasičnim PCR smo dokazali z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 2 % agarozni gel (ki vsebuje 1 g agaroze ter 50 ml 1x pufra TAE (tris/acetat/EDTA)). Po segrevanju smo raztopljeni agarosi dodali 5 µl Siber Green barvila (SYBR® Safe DNA stain, Invitrogen, Eugene, Oregon, ZDA), ki se uporablja kot različica etidijevega bromida in deluje kot fluorescentno barvilo, ki se vgradi v DNA vijačnico, vendar ni mutagen. Na gel smo vnesli molekularni označevalec, 100 bp DNA ladder (GeneRuler, Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija) ter po 10 µl pridelkov PCR. Elektroforeza je tekla 30 minut pri napetosti 80 V. Po končani elektroforezi smo gel analizirali v inštrumentu GelDoc-It TS Imaging System (UVP, Nuffield Road, Cambridge, Anglija) ter ga fotografirali. Pozitivni rezultati so se nahajali na nivoju 400 baznih parov, saj so naši pridelki PCR veliki 390 baznih parov.

3.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

3.2.4.1 Teoretične osnove

Nukleotidna zaporedja določamo z metodo sekveniranja po Sangerju. Danes je v uporabi avtomatizirana različica, ki je radioaktivne označevalce nadomestila s fluorescentno označenimi dideksinukleotidtrifosfati (ddNTP) (Chan, 2005), kateri imajo na mestu 3' vezano skupino –H, namesto skupine –OH (Sanger in sod., 1977). Zamenjava funkcionalne

skupine povzroči prekinitev podaljševanja verige DNA in nastanek različno dolgih odsekov DNA (Sanger in sod., 1977).

Nukleotidno zaporedje določamo v štirih ločenih sekvenčnih reakcijah, kjer vsaka reakcija vsebuje specifičen terminator (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), ki je označen z drugim barvilom. Ločevanje pridelkov poteka s kapilarno gelsko elektroforezo, kjer se DNA ujame v polimer, laserski čitalec pa zazna značilne fluorescenčne spektre barvil na posameznih ddNTP-jih ter jih prikaže v obliki podatkov, katere računalniško obdelamo (Chan, 2005).

3.2.4.2 Čiščenje pridelkov PCR

Čiščenje pridelkov PCR je potrebno, da odstranimo morebitne ostanke začetnih oligonukleotidov, deoksinukleotidov (dNTP) ter ostanke polimeraze Taq. Uporabili smo komplet reagentov WIZARD[®] SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA), po navodilih proizvajalca. Princip čiščenja temelji na vezavi nukleinske kisline na silika membrano posebne kolone s kaotropnimi soli. Očiščene pridelke PCR smo do uporabe shranili pri 4 °C.

3.2.4.3 Določanje koncentracije očiščenih pridelkov PCR

Po čiščenju pridelkov PCR smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili prisotnost očiščenih pridelkov PCR, saj se lahko med čiščenjem določen delež pridelka PCR izgubi. Po končani elektroforezi, smo glede na jakost fragmentov pridelkov PCR, določili količino, ki jo bomo uporabili v sekvenčni reakciji. Ta korak je potreben za optimalno delovanje sekvenčne reakcije, saj je potrebno prilagoditi količine reagentov količini pridelkov PCR.

3.2.4.4 Sekvenčna reakcija

Sekvenčno reakcijo izvedemo ločeno v dveh delih, saj želimo določiti nukleotidno zaporedje vsake od verig dvojne vijačnice. Uporabili smo komercialno dostopen komplet reagentov BigDye[®] terminator cycler sequencing ready reaction kit (ABI Prism, PE Applied Biosystem, Foster City, Kalifornija, ZDA), ki omogočajo uporabo poljubnih začetnih oligonukleotidov znotraj pomnoženega zaporedja (Preglednica 6). Tako smo lahko uporabili enake začetne oligonukleotide kot pri klasičnem PCR za dokazovanje HRV. Glede na intenzivnost UV svetlobe smo uporabili primerno količino nukleinske kisline v sami sekvenčni reakciji (Preglednica 6).

Preglednica 6: Reagenti, ki sestavljajo reakcijsko mešanico za sekvenčno reakcijo.

Reagenti	Volumen
Začetni oligonukleotidi (50 μ M)	1,3 μ l
Reakcijski pufer	3-8 μ l
Sekvenčna mešanica (polimeraza DNA FS – različica polimeraze DNA Taq, dNTP, ddNTP)	0-4 μ l
Voda prosta nukleaz	8,7-10,7 μ l
Nukleinska kislina	2-5 μ l

Sekvenčna reakcija je potekla v 25 ciklih, potek je prikazan v preglednici 7. Po sekvenčni reakciji je sledilo ohlajanje reakcijske mešanice na 4 °C.

Preglednica 7: Potek sekvenčne reakcije za določanje nukleotidnega zaporedja HRV. HRV – rinovirus.

Proces	Čas	Temperatura	Število ciklov
Denaturacija DNA	10 sekund	96 °C	25
Pripenjanje začetnih oligonukleotidov	5 sekund	50 °C	25
Podaljševanje začetnih oligonukleotidov	4 minute	60 °C	25

3.2.4.5 Čiščenje pridelkov sekvenčne reakcije

Komplet reagentov BigDye[®] XTerminator[™] (Applied Biosystem, PN 4374408) je namenjen čiščenju pridelkov po sekvenčni reakciji. Temelji na vezavi ostankov reakcije na silikatne delce, ki se med centrifugiranjem posedejo na dno. Komplet reagentov BigDye[®] XTerminator[™] je sestavljen iz dveh reagentov, raztopine SAM[™] in reagenta XTerminator. Raztopina SAM[™] izboljša delovanje reagenta XTerminator in ohranja integriteto pridelkov sekvenčne reakcije. Reagent XTerminator pa veže nevezane ostanke sekvenčne reakcije ter tako prepreči nespecifično vezavo barvil na pridelke sekvenčne reakcije. Pred uporabo je potrebno reagente BigDye[®] XTerminator[™] obvezno segreti na sobno temperaturo. Prav tako je pomembno, da v reagentu SAM[™] ni trdih delcev. V kolikor se pojavijo, raztopino segrejemo na 37 °C ter jo ponovno ohladimo na sobno temperaturo. Reagent XTerminator

mešamo vsaj 10 sekund pred uporabo, saj se silikatni delci v raztopini ne smejo posesti. V vsako vdolbinico z vzorcem na mikrotitrski ploščici odpipetiramo 20 µl reagenta XTerminator in 90 µl raztopine SAM™. Mikrotitrsko ploščico z vzorci tesno zalepimo s folijo in stresamo na vibracijskem mešalu 30 minut pri 2000 obratih na minuto.

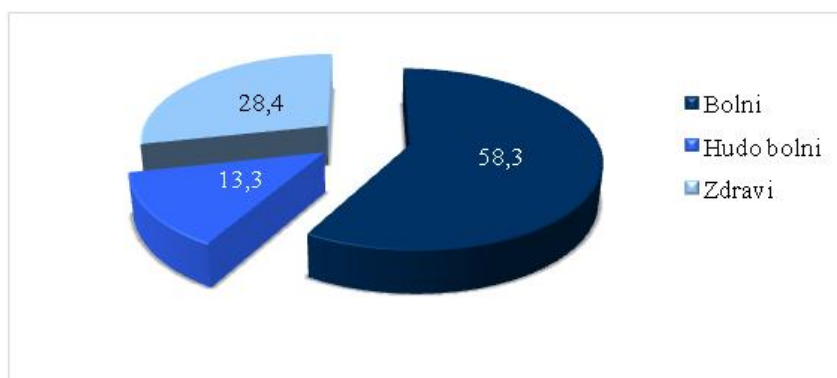
3.2.4.6 Določanje nukleotidnega zaporedja očiščenih pridelkov PCR

Po stresanju smo pridelke sekvenčne reakcije postavili v avtomatski sekvenator 3500 Genetic Analyser ABI (Hitachi, Japonska). Sekvenator deluje tako, da ločuje posamezne odseke v kapilari s prilagojenim polimerom (POP6), medtem ko laserski čitalec zaznava fluorescenco barvil, ki so vezana na ddNTP-jih. Rezultate dobimo izpisane v obliki elektroferograma, kar nam omogoča računalniški program 3500 Genetic Analyser software (Applied Biosystems, Life Technologies).

4 REZULTATI

4.1 VZORCI IN PREISKOVANCI

V raziskavo o molekularni epidemiologiji rinovirusov pri otrocih, smo vključili 549 vzorcev dihal iz raziskave VODP, ki je v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011 potekala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Vzorci dihal so bili poslani iz Univerzitetnega Kliničnega centra Ljubljana, iz dveh različnih oddelkov. Iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja smo prejeli 320 (58,3 %) vzorcev dihal ter iz Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo 229 (41,7 %) vzorcev dihal, od tega je 156 (28,4 %) vzorcev pripadalo zdravim otrokom in 73 (13,3 %) otrokom s težko potekajočo okužbo spodnjih dihal. Zaradi lažjega razumevanja smo pediatrične bolnike iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja poimenovali »bolni« ter pediatrične bolnike iz Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, s simptomi okužbe dihal »hudo bolni. Pediatrične bolnike iz Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, ki so bili sprejeti zaradi elektivnega kirurškega posega in niso kazali znakov okužbe dihal, smo poimenovali »zdravi«.



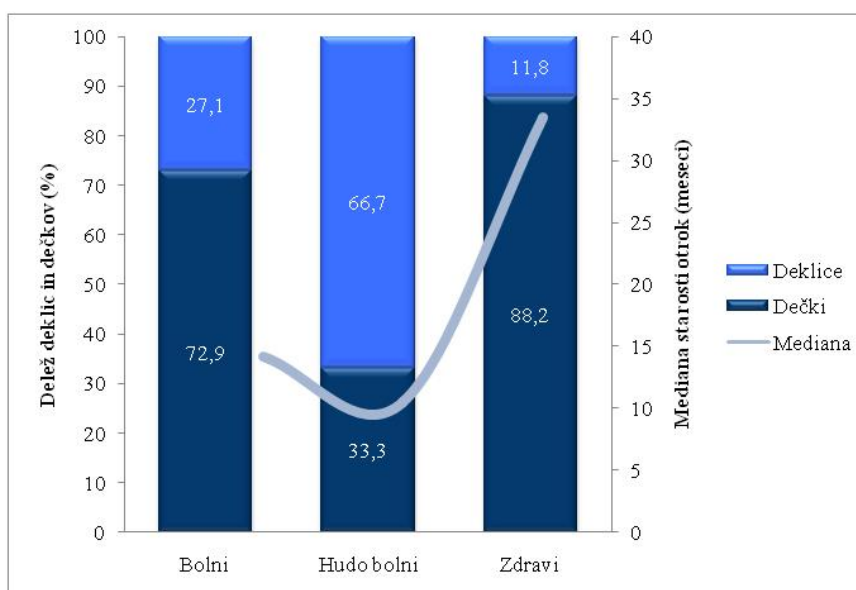
Slika 4: Delež poslanih vzorcev dihal glede na zdravstveno stanje otrok.

Prisotnost rinovirusov smo dokazali z metodo RT-PCR v realnem času. Med pediatričnimi bolniki z diagnozo bronhiolitisa, na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja, smo prisotnost HRV dokazali v 87 (27,2 %) vzorcih dihal, od tega jih je 25 (28,7 %) pripadalo deklicam in 62 (71,3 %) dečkom. Otroci so bili stari med 1,2 in 33,2 mesecev (mediana 14,2 mesecev).

Med pediatričnimi bolniki s težko okužbo spodnjih dihal, na Kliničnem oddelku za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, smo HRV dokazali v 21 (28,8 %) vzorcih dihal, in sicer 14

(66,7 %) vzorcev je pripadalo deklicam in 7 (33,3 %) dečkom. Otroci so bili stari med 1 in 72 mesecev (mediana 10,5 mesecev).

V kontrolno skupino smo vključili zdrave otroke, ki so bili prav tako sprejeti na Klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, zaradi elektivnega kirurškega posega, vendar niso kazali znakov okužbe dihal. HRV smo dokazali v vzorcih dihal pri 17 (10,9 %) zdravih otrocih, in sicer 2 (11,8 %) vzorca sta pripadala deklicama in 15 (88,2 %) dečkom. Stari so bili med 1,5 in 70,4 mesecev (mediana 33,5 mesecev).



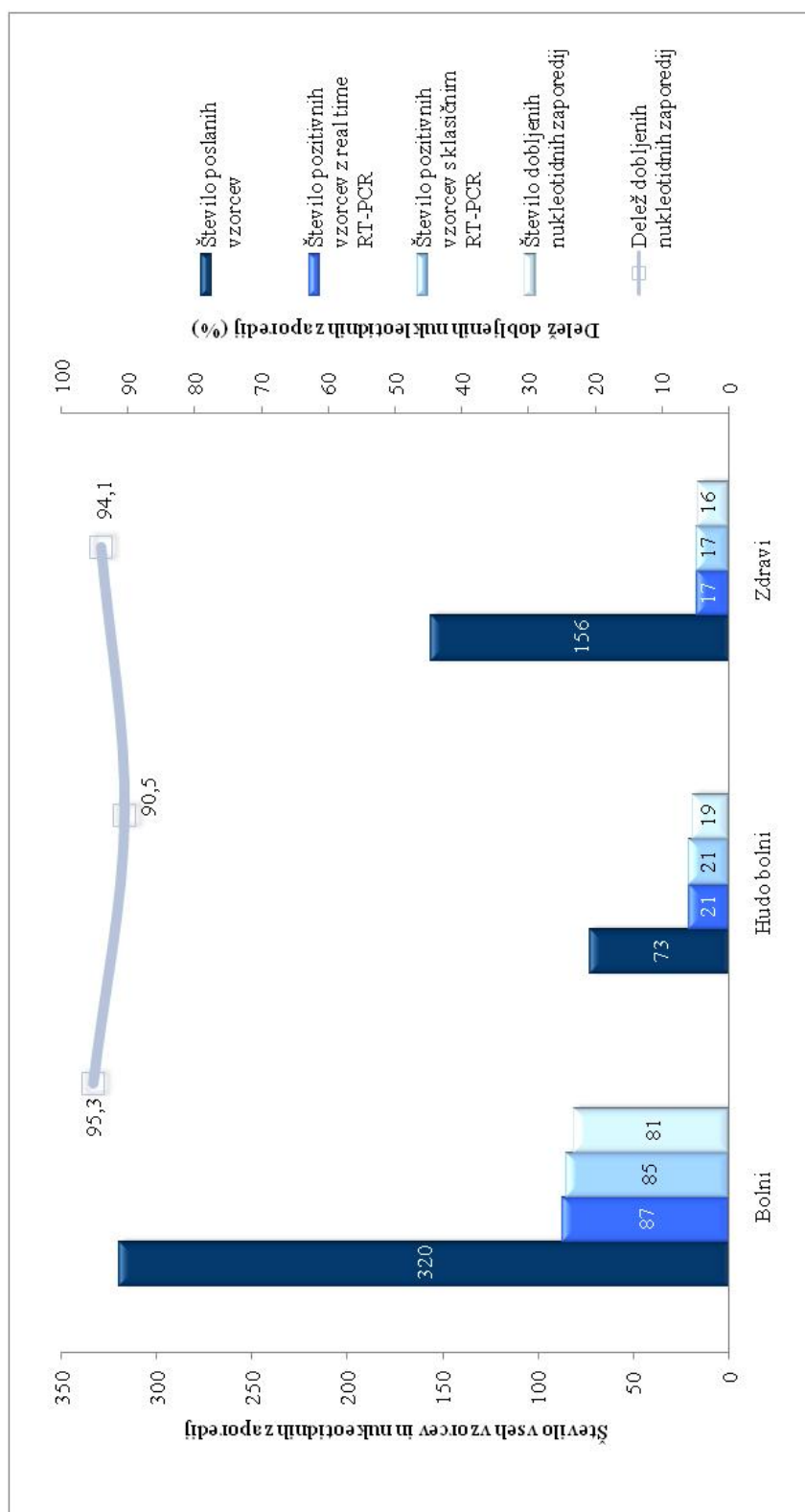
Slika 5: Delež deklic in dečkov, pri katerih smo po analizi s klasičnim RT-PCR v vzorcih dihal dokazali prisotnost HRV ter mediana starosti otrok v posamezni skupini bolnikov. HRV – rinovirus.

4.2 DOKAZ PRISOTNOSTI RINOVIRUSOV Z RT-PCR V REALNEM ČASU IN KLASIČNIM RT-PCR TER DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA DELA REGIJE 5' NCR

Prisotnost HRV v vzorcih dihal smo najprej dokazali z metodo RT-PCR v realnem času ter potrdili njihovo prisotnost v skupno 125 (22,8 %) od 549 vključenih vzorcev. Za nadaljnje raziskave smo prisotnost HRV potrdili s klasičnim RT-PCR, in sicer v 123 (22,4 %) vzorcih dihal. Prisotnost HRV smo potrdili v vseh vzorcih dihal hudo bolnih (21) in zdravih otrok (17), medtem ko smo v vzorcih dihal bolnih otrok, s klasičnim RT-PCR dokazali virus v 85 (97,7 %) vzorcih (Slika 6).

V vzorcih dihal, v katerih smo s klasičnim RT-PCR dokazali prisotnost HRV, smo določili nukleotidna zaporedja dela regije 5' NCR HRV. Dobljena nukleotidna zaporedja smo analizirali z uporabo medmrežnega orodja BLAST (2013) (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA).

Nukleotidna zaporedja smo določili v vzorcih dihal, v katerih smo s klasičnim RT-PCR dokazali prisotnost HRV ter jih uspešno določili v 116 (94,3 %) vzorcih. Nukleotidno zaporedje dela regije 5' NCR HRV smo določili v 81 (95,3 %) vzorcih dihal bolnih otrok, v 19 (90,5 %) vzorcih dihal hudo bolnih otrok ter v 16 (94,1 %) vzorcih dihal zdravih otrok (Slika 6).

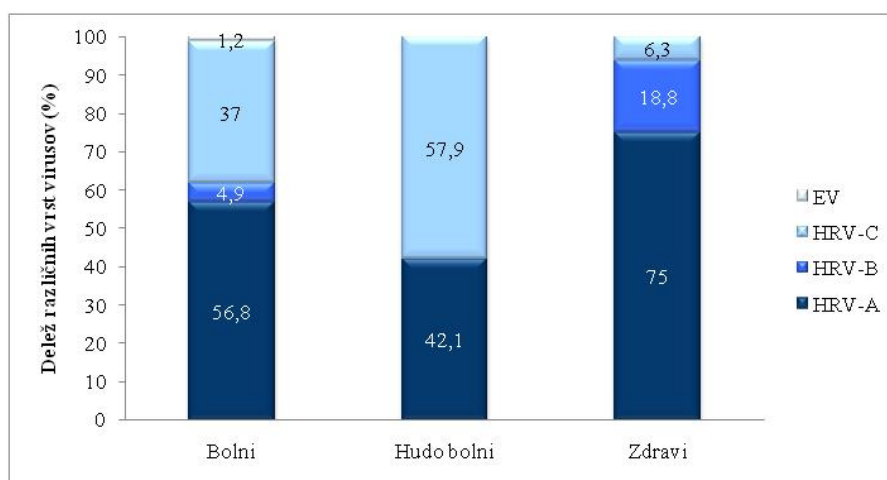


Slika 6: Število vzorcev v katerih smo z RT-PCR v realnem času in s klasičnim RT-PCR dokazali prisotnost HRV ter število in delež dobjenih nukleotidnih zaporedij. HRV – rinovirus.

4.3 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ

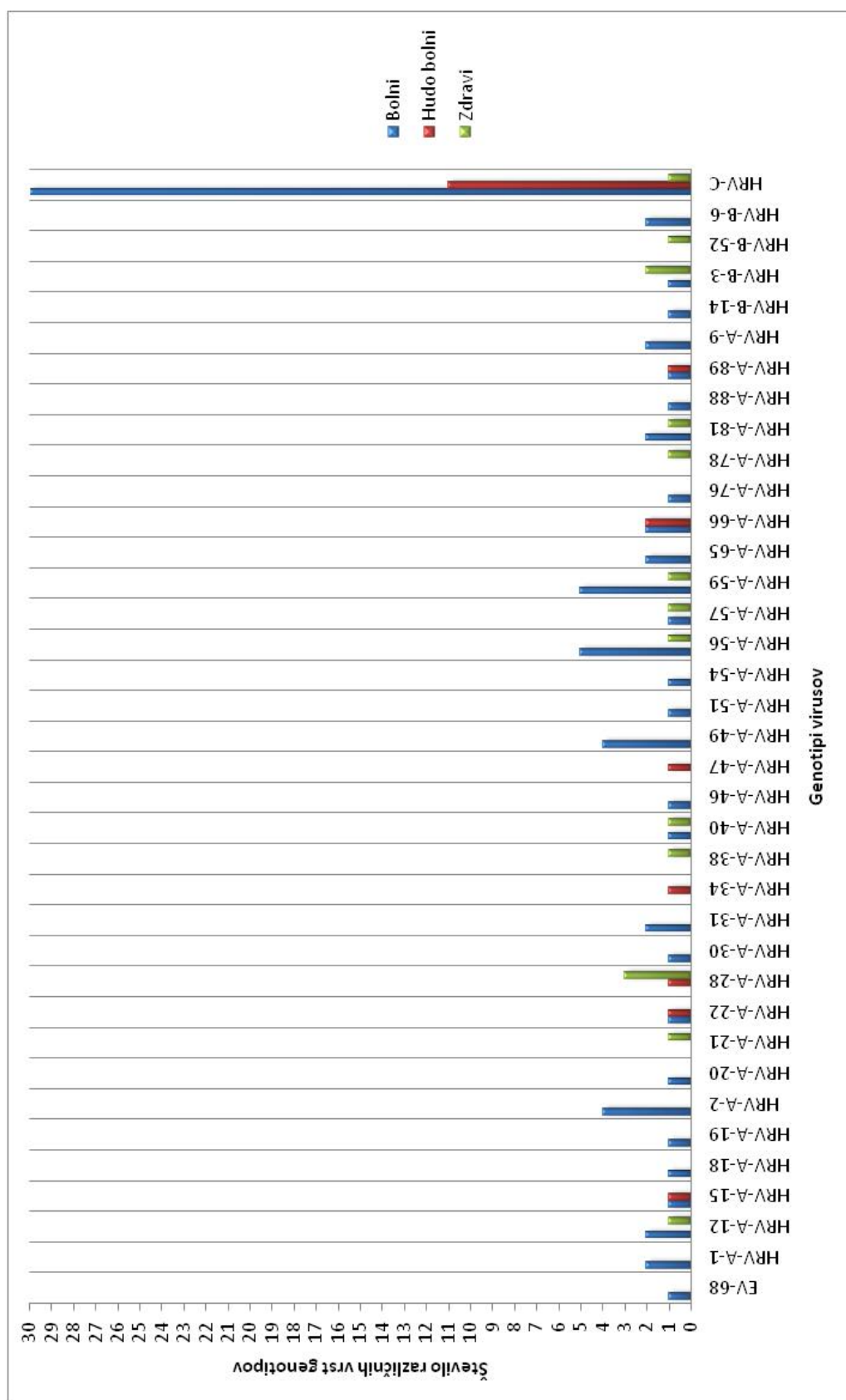
Dobljena nukleotidna zaporedja rinovirusov smo analizirali z uporabo programskega paketa CLC Main Workbench, verzija 6 (CLC bio, Cambridge, Massachusetts, ZDA). Z analizo nukleotidnega zaporedja dela regije 5' NCR HRV smo določili rinoviruse vrste A, B in C. Urejena nukleotidna zaporedja smo primerjali z že znanimi nukleotidnimi zaporedji v genski banki (GenBank) z uporabo medmrežnega orodja BLAST (2013) (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA).

V skupini bolnih pediatričnih bolnikov, ki so se zdravili zaradi bronhiolitisa, smo HRV-A določili v 46 (56,8 %) vzorcih dihal, HRV-B v 4 (4,9 %) vzorcih dihal, HRV-C v 30 (37 %) vzorcih dihal ter enterovirus (EV) v enem (1,2 %) vzorcu dihal. V skupini hudo bolnih pediatričnih bolnikov smo HRV-A določili v 8 (42,1 %) vzorcih dihal in HRV-C v 11 (57,9 %) vzorcih dihal. V skupini zdravih otrok, smo HRV-A določili v 12 (75 %) vzorcih dihal in HRV-B v 3 (18,8 %) vzorcih dihal. V tej skupini otrok smo HRV-C dokazali v enem (6,3 %) vzorcu dihal. (Slika 7).



Slika 7: Delež različnih vrst virusov glede na zdravstveno stanje otrok. HRV - rinovirus, EV - enterovirus.

Genotipi rinovirusov, ki smo jih na podlagi regije 5' NCR HRV določili v vseh vzorcih dihal, so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Število različnih vrst genotipov virusov, ki smo jih določili v vseh vzorcih, dihal v katerih smo dokazali prisotnost HRV in EV. HRV - rinovirus, EV - enterovirus.

4.4 SEZONSKA RAZPOREDITEV RINOVIRUSNIH GENOTIPOV

Zanimalo nas je v katerih mesecih se pojavljajo različni genotipi rinovirusov. Želeli smo ugotoviti ali isti genotipi povzročajo okužbe dihal v istem obdobju. V vzorcih dihal bolnih otrok se genotipi HRV-A pojavljajo v vseh mesecih od septembra do junija, z vrhom v decembru, ko so povzročili največ okužb (21,7 %). Genotipi HRV-C se pojavljajo septembra ter od novembra do junija, z vrhom v aprilu, ko so povzročili največ okužb (23,3 %). Rezultati kažejo, da okužbe dihal pri bolnih otrocih povzročene s HRV-C prevladujejo v spomladanskih mesecih (marec, april, maj). Isti genotipi rinovirusov, večinoma povzročajo okužbe v istih mesecih oz. istih tromesečjih. Genotipi HRV-B pa se pojavljajo le v zimskih mesecih, od novembra do januarja (Preglednica 8)

V vzorcih dihal hudo bolnih otrok smo dokazali okužbe, ki so jih povzročili genotipi HRV-A in HRV-C. Genotipi HRV-A se pojavljajo v jesenskih in zimskih mesecih, od novembra do februarja ter meseca aprila, z vrhom v decembru, ko so povzročili največ okužb (37,5 %). Genotipi HRV-C se pojavljajo na prehodu iz jeseni v zimo, novembra in decembra, na prehodu iz zime v pomlad, februarja in marca ter meseca maja. Največ okužb (36,4 %) so povzročili meseca novembra (Preglednica 9).

V vzorcih dihal zdravih otrok se genotipi HRV-A pojavljajo od oktobra do avgusta, vendar najpogosteje v jesenskih in zimskih mesecih, z vrhom v oktobru in novembru, ko smo jih dokazali v največ (25 %) vzorcih dihal. Genotipi HRV-B prevladujejo v jesenskih mesecih in v mesecu decembru. HRV-C se je pojavil samo v enem primeru, meseca maja (Preglednica 10).

Na sliki 9 je prikazano število vseh virusov, ki smo jih s klasično metodo RT-PCR dokazali v vseh vzorcih dihal vseh pediatričnih bolnikov ter jih na podlagi regije 5' NCR HRV razvrstili v ustrezne genotipe.

Preglednica 8: Pojavnost različnih vrst virusov glede na mesece, v vzorcih dihal bolnih otrok v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011. HRV – rinovirus, EV – enterovirus.

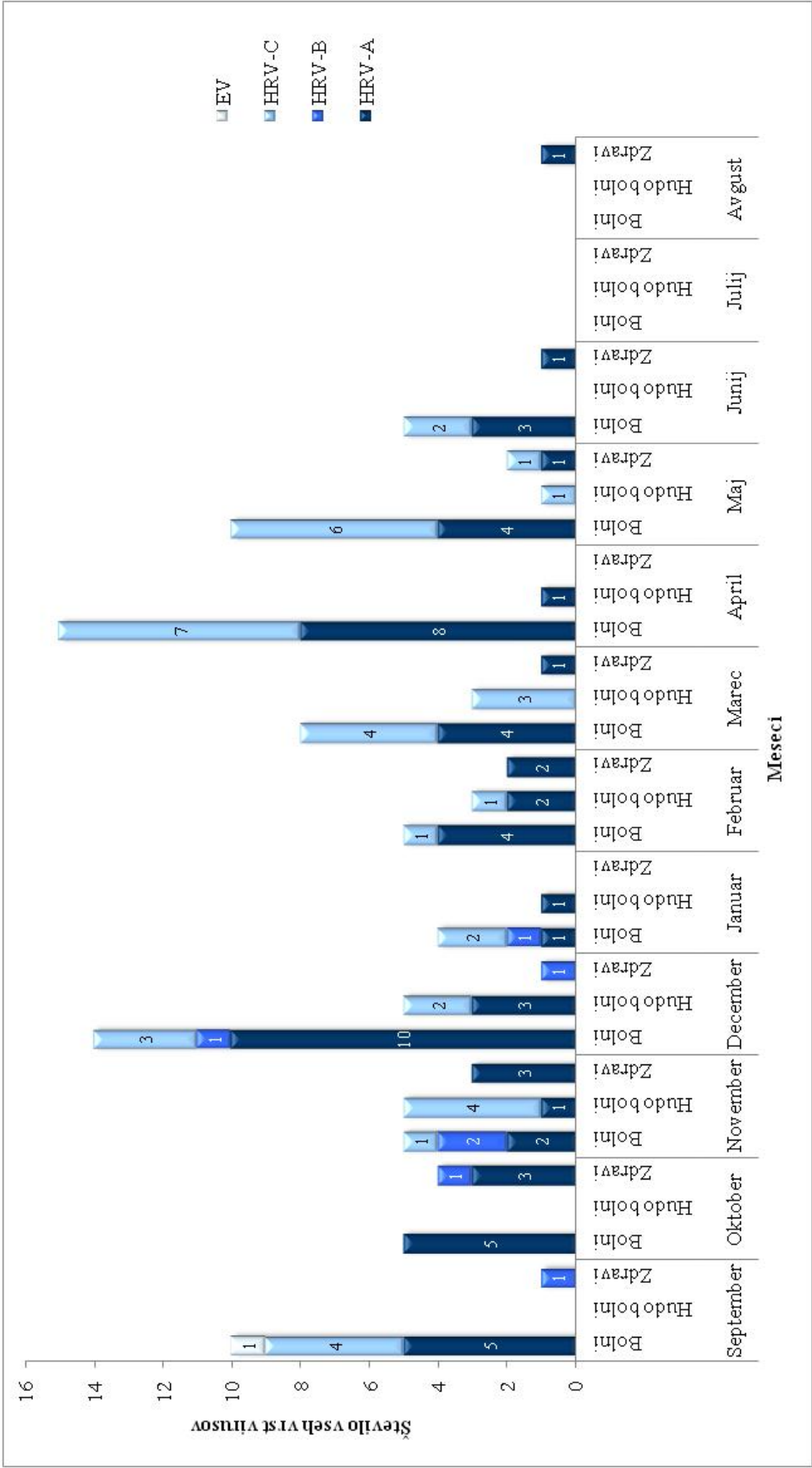
September	Oktober	November	December	Januar	Februar	Marec	April	Maj	Junij	Julij	Avgust
HRV-A-1	HRV-A-9	HRV-A-20	HRV-A-2	HRV-A-59	HRV-A-12	HRV-A-2	HRV-A-2	HRV-A-2	HRV-A-22		
HRV-A-1	HRV-A-9	HRV-A-30	HRV-A-12	HRV-B-6	HRV-A-19	HRV-A-65	HRV-A-18	HRV-A-40	HRV-A-31		
HRV-A-49	HRV-A-15	HRV-B-3	HRV-A-56	HRV-C	HRV-A-56	HRV-A-66	HRV-A-31	HRV-A-65	HRV-A-51		
HRV-A-49	HRV-A-49	HRV-B-6	HRV-A-56	HRV-C	HRV-A-59	HRV-A-81	HRV-A-46	HRV-A-81	HRV-C		
HRV-A-76	HRV-A-88	HRV-C	HRV-A-56		HRV-C	HRV-C	HRV-A-49	HRV-C	HRV-C		
HRV-C			HRV-A-56			HRV-C	HRV-A-54	HRV-C			
HRV-C			HRV-A-57			HRV-C	HRV-A-66	HRV-C			
HRV-C			HRV-A-59			HRV-C	HRV-A-89	HRV-C			
HRV-C			HRV-A-59				HRV-C	HRV-C			
EV-68			HRV-A-59				HRV-C	HRV-C			
			HRV-B-14				HRV-C				
			HRV-C				HRV-C				
			HRV-C				HRV-C				
			HRV-C				HRV-C				

Preglednica 9: Pojavnost HRV glede na mesece, v vzorcih dihal hudo bolnih otrok v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011. HRV – rinovirus.

September	Oktober	November	December	Januar	Februar	Marec	April	Maj	Junij	Julij	Avgust
		HRV-A-66	HRV-A-15	HRV-A-89	HRV-A-28	HRV-C	HRV-A-66	HRV-C			
		HRV-C	HRV-A-22		HRV-A-47	HRV-C					
		HRV-C	HRV-A-34		HRV-C	HRV-C					
		HRV-C	HRV-C								
		HRV-C	HRV-C								

Preglednica 10: Pojavnost HRV glede na mesece, v vzorcih dihal zdravih otrok v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011. HRV – rinovirus.

[illegible]



Slika 9: Število vseh vrst virusov dokazanih v vzorcih dihal vseh pediatričnih bolnikov, sprejetih v bolnišnično oskrbo v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011.
HRV – rinovirus, EV – enterovirus.

4.5 SOČASNE OKUŽBE Z DRUGIMI VIRUSNIMI POVZROČITELJI OKUŽB DIHAL

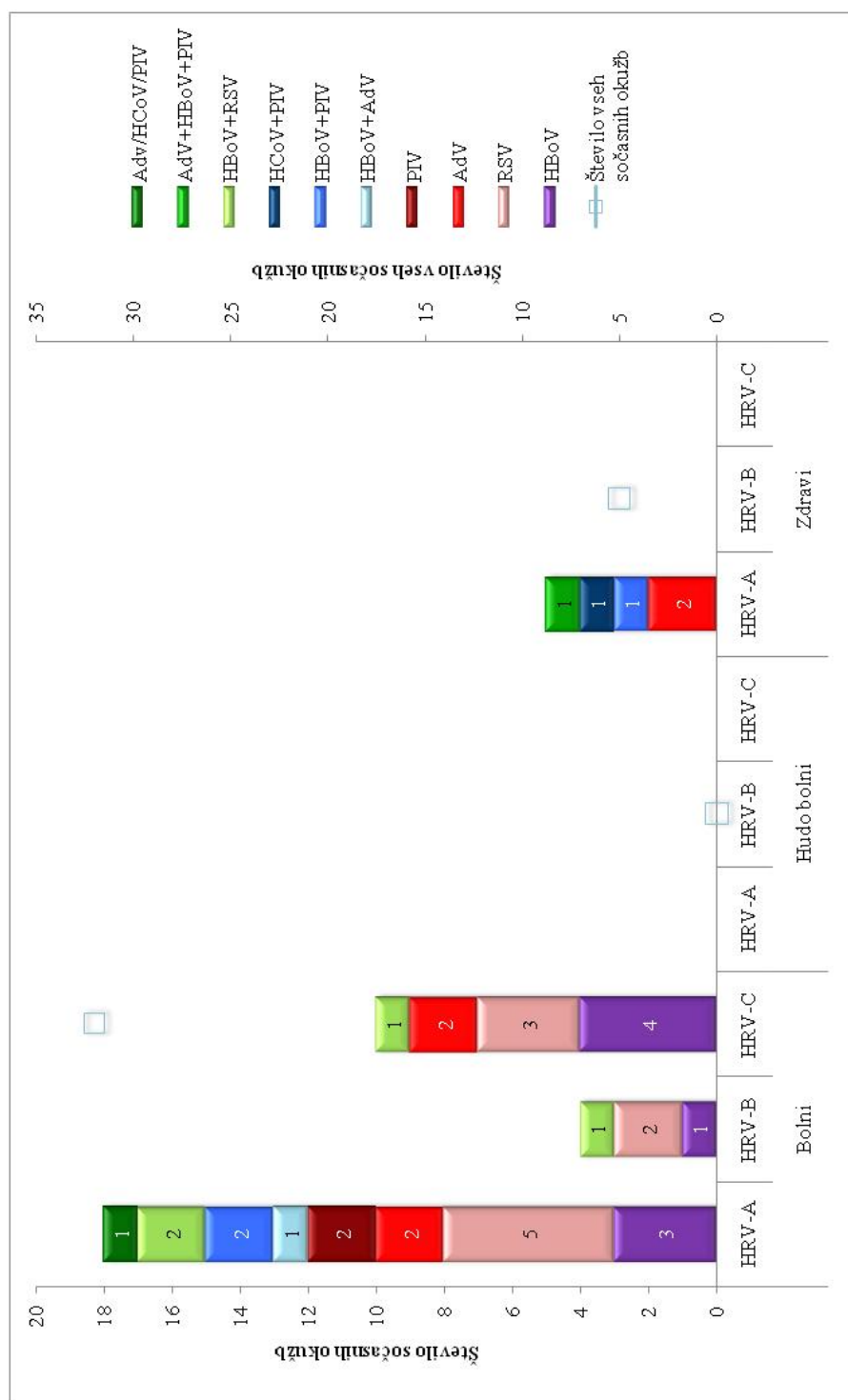
Rinoviruse lahko dokažemo kot edine povzročitelje okužbe dihal ali skupaj z drugimi virusi. V vzorcih dihal bolnih otrok, smo HRV-C dokazali kot edine povzročitelje okužbe v 20 (66,7 %) od skupno 30 vzorcev. V 10 (33,3 %) vzorcih dihal smo poleg HRV-C dokazali prisotnost še vsaj enega virusa. In sicer v 4 (40 %) vzorcih smo poleg HRV-C dokazali prisotnost človeškega bokavirusa (HBoV), v 3 (30 %) vzorcih respiratorni sincicijski virus (RSV) in v 2 (20 %) vzorcih adenovirus (AdV). V enem (10 %) vzorcu pa smo poleg rinovirusa dokazali še 2 različna virusna povzročitelja, in sicer človeški bokavirus (HBoV) in respiratorni sincicijski virus (RSV). V 28 (60,9 %) od 46 vzorcev dihal, v katerih smo dokazali prisotnost HRV-A, smo le-te dokazali kot edine povzročitelje okužb dihal. V 18 (39,1 %) vzorcih dihal smo poleg HRV-A dokazali še vsaj en virus. V 2 (11,1 %) vzorcih smo dokazali prisotnost adenovirusa (AdV), v 3 (16,7 %) vzorcih človeški bokavirus (HBoV), v 2 (11,1 %) vzorcih virus parainflunce (PIV) ter v 5 (27,8 %) vzorcih respiratorni sincicijski virus (RSV). V 5 vzorcih smo poleg rinovirusa dokazali najmanj 2 različna virusna povzročitelja, in sicer v 2 (11,1 %) vzorcih smo dokazali prisotnost respiratornega sincicijskega virusa (RSV) in človeški bokavirus (HBoV), v enem (5,6 %) vzorcu človeški bokavirusi (HBoV) in adenovirusi (AdV) ter v 2 vzorcih človeški bokavirus (HBoV) in virus parainflunce (PIV). V enem (5,6 %) vzorcu pa smo poleg rinovirusov dokazali prisotnost 3 različnih virusnih povzročiteljev, in sicer človeški koronavirus (HCoV), respiratorni sincicijski virus (RSV) ter adenovirus (AdV). V vseh 4 vzorcih dihal, v katerih smo dokazali okužbo s HRV-B, smo dokazali še druge viruse, ki povzročajo okužbe dihal. V 2 (50 %) vzorcih smo dokazali prisotnost respiratornega sincicijskega virusa (RSV) in v enem (25 %) vzorcu človeški bokavirus (HBoV). V enem (25%) vzorcu pa smo poleg rinovirusa dokazali prisotnost človeškega bokavirusa (HBoV) in respiratorni sincicijski virus (RSV).

V vzorcih dihal hudo bolnih otrok so bili rinovirusi edini povzročitelji okužb dihal.

V vzorcih dihal zdravih otrok, smo dokazali samo eno okužbo s HRV-C, kot edinim povzročiteljem okužbe dihal. V 7 (58,3 %) od 12 vzorcev dihal, v katerih smo dokazali prisotnost HRV-A, smo le-te dokazali, kot edine povzročitelje okužbe dihal. V 5 vzorcih dihal (41,7 %) smo poleg HRV-A dokazali še vsaj en virus. V 2 (40 %) vzorcih smo dokazali prisotnost adenovirusa (AdV). V enem (20 %) vzorcu smo dokazali prisotnost človeškega bokavirusa (HBoV) in virus parainflunce (PIV) ter v enem (20 %) vzorcu človeški

koronavirus (HCoV) in virus parainfluenze (PIV). V prav tako enem (20 %) vzorcu smo dokazali še človeški bokavirus (HBoV), virus parainfluenze (PIV) in adenovirus (AdV).

V vseh 3 vzorcih dihal, v katerih smo dokazali prisotnost HRV-B, smo le-te dokazali, kot edine povzročitelje okužbe dihal.



Slika 10: Število sočasnih okužb HRV z drugimi virusnimi povzročitelji okužb dihal, glede na vrsto HRV in zdravstveno stanje otrok ter število vseh sočasnih okužb v skupini bolnih, hudo bolnih in zdravih pediatričnih bolnikov. HRV - rinovirus.

5 RAZPRAVA

Rinoviruse so prvič osamili leta 1956 ter jih opredelili kot najpogostejše povzročitelje okužb dihal, saj so jih uspešno osamili iz četrtnine vzorcev, odvzetih bolnikom z okužbo zgornjih dihal. Razvoj občutljivih in specifičnih molekularnih metod, je kasneje privedel do odkritja večjega števila novih rinovirusov (Peltola in sod., 2008).

Danes poznamo več kot 100 različnih tipov rinovirusov. Razvoj molekularnega določanja nukleotidnih zaporedij je omogočil odkritje dveh glavnih skupin, rinovirusi vrste A in rinovirusi vrste B. Nukleotidna zaporedja so določili na podlagi analize regije VP4/VP2 in regije VP1. S pojavom občutljivejših molekularnih metod, so raziskovalci odkrili novo skupino rinovirusov, ki so jo poimenovali rinovirusi vrste C. Nadaljnje raziskave so pripeljale do odkritja dveh podskupin rinovirusov znotraj vrste C, in sicer rinovirusi vrste Ca in Cc (Bochkov in Gern, 2012).

Rinovirusi, ki jih uvrščamo v skupini A in B so zelo dobro poznani. Najpogosteje povzročajo prehladna obolenja. Prisotni so tudi v vzorcih dihal bolnikov s simptomi piskanja ali pljučnice Lau in sod., 2007) ter pri majhnih otrocih in odraslih z diagnozo astme (Gern in Busse., 1999).

Novo odkrita skupina rinovirusov vrste C povzroča različne okužbe dihal, ki se pojavljajo po vsem svetu. Njihova patogeneza se razlikuje od patogeneze rinovirusov vrste A in B, saj povzročajo gripi podobna obolenja (Lamson in sod., 2006), akutne okužbe spodnjih dihal, bronhiolitis, pljučnico, (McErlean in sod., 2008) ter poslabšanje piskanja in astme (Khetsuriani in sod., 2008). Zadnje analize potrjujejo večjo virulentnost rinovirusov vrste C, vendar so za dokončne potrditve potrebne dodatne raziskave.

Magistrsko delo vključuje pediatrične bolnike, hospitalizirane na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja ter Pediatrično kliniko, Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, Univerzitetnega Kliničnega Centra, Ljubljana. V okviru naše raziskave smo vzorce pediatričnih bolnikov, glede na njihovo zdravstveno stanje, uvrstili v tri skupine, in sicer skupino bolnih, hudo bolnih in zdravih otrok. V raziskavah drugih držav po svetu prav tako najdemo podatke o deležih rinovirusov, dokazanih v vzorcih dihal otrok, vendar so le-ti razdeljeni na dve skupini, bolne in zdrave, medtem, ko smo v naši raziskavi bolne otroke

razdelili na hudo bolne, s težkim potekom okužbe spodnjih dihal, ki so bili hospitalizirani na Pediatrični kliniki, Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo ter bolne s klinično sliko bronhiolitisa, ki so bili hospitalizirani na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja. Glede na objave tujih raziskav lahko potrdimo, da je naša raziskava prva na svetu, ki je bolne paciente, glede na zdravstveno stanje, obravnavala kot dve ločeni skupini.

V našo raziskavo smo vključili 320 vzorcev dihal bolnih otrok, starih do 6 let, iz prvotne 2-letne raziskave VODP, kar jo glede na druge raziskave po svetu, uvršča med večje raziskave molekularne epidemiologije rinovirusov pri otrocih. Prisotnost rinovirusov smo potrdili na podlagi regije 5' NCR HRV, ki smo jo pomnožili z RT-PCR v realnem času. Naše rezultate bolnih otrok najlažje primerjamo z rezultati tajske raziskave, kjer so v obdobju dveh let zbrali 520 vzorcev dihal pediatričnih bolnikov starih do 4 let, ki so bili hospitalizirani zaradi hude okužbe spodnjih dihal. Tajski raziskovalci so prisotnost rinovirusov prav tako dokazali na podlagi regije 5' NCR HRV, pri čemer pa so uporabili vgnezdene RT-PCR. V naši raziskavi smo dokazali prisotnost rinovirusov v 27,2 % vzorcih dihal bolnih otrok ter 28,8 % vzorcih dihal hudo bolnih otrok, kar je primerljivo z rezultati tajske raziskave, kjer so dokazali prisotnost rinovirusov v 28,9 % vzorcih dihal bolnih otrok. Tajski raziskovalci so v raziskavo vključili hospitalizirane bolnike, pri katerih so v 48 urah od sprejema v bolnišnico izvedli radiološko preiskavo pljuč. S tem so iz raziskave izključili možne bolnike s hudo okužbo spodnjih dihal, ki jih povzročajo rinovirusi. Prav tako je potrebno omeniti, da so v raziskavo vključili bolnike vseh starosti ter jih razdelili v več starostnih skupin. Ob koncu raziskave so namreč ugotovili, da je največji delež okužb, ki so jih povzročili rinovirusi, v skupini otrok do 4 let (Fry in sod., 2011).

V ameriški in jordanski raziskavi so rinoviruse, pri hospitaliziranih otrocih z okužbo spodnjih dihal, dokazali v podobnem deležu kot v naši raziskavi. Otroci so bili stari do 5 let (Iwane in sod., 2011; Miller in sod., 2009b). Ameriški raziskovalci so iz raziskave izključili otroke, ki so že bili sprejeti v bolnišnico vsaj 4 dni pred sprejemom zaradi akutne okužbe spodnjih dihal, novorojenčke, ki so bili v bolnišnici od rojstva, otroke z nevtropenijo ter otroke, ki so bili ob hospitalizaciji zaradi okužbe spodnjih dihal bolni več kot 14 dni (Iwane in sod. 2011). Prisotnost rinovirusov so dokazali v 14,9 % vzorcih dihal, medtem, ko so jordanski raziskovalci dokazali prisotnost rinovirusov v 33 % vzorcih (Iwane in sod., 2011; Miller in sod., 2009b). Ameriški raziskovalci so v raziskavo vključili 1515 vzorcev dihal, ki so jih

zbrali v obdobju 12 mesecev, jordanski raziskovalci pa so 728 vzorcev dihal zbrali v obdobju 3 mesecev. Obe raziskavi sta prisotnost rinovirusov potrdili z metodo RT-PCR v realnem času, kjer so analizirali regijo 5' NCR HRV (Iwane in sod., 2011; Miller in sod., 2009b).

V naši raziskavi smo v kontrolno skupino vključili 157 vzorcev dihal zdravih otrok, starih do 6 let, ki so bili zaradi elektivnega kirurškega posega hospitalizirani na Pediatrični kliniki, Kliničnega oddelka za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo ter dokazali prisotnost rinovirusov v 10,8 % vzorcih. Prisotnost rinovirusov smo potrdili z uporabo enake molekularne metode, kot pri določanju rinovirusov v vzorcih dihal pediatričnih bolnikov.

Raziskave o molekularni epidemiologiji rinovirusov med otroci redko vsebujejo kontrolno skupino, vendar so jih v svoje raziskave vključili že zgoraj omenjeni raziskovalci (Fry in sod., 2011; Iwane in sod., 2011). Na podlagi rezultatov drugih raziskav vidimo, da le-ti sovpadajo z rezultati naše raziskave, kar potrjuje pojavnost rinovirusov pri otrocih brez znakov okužbe dihal. Tajski raziskovalci so v kontrolno skupino vključili otroke stare do 4 let, ki niso kazali znakov okužbe dihal (povišana telesna temperatura, kašelj, vneto grlo ali diareja) 3 dni pred sprejemom v bolnišnico. V raziskavo so vključili 85 vzorcev dihal ter dokazali prisotnost rinovirusov v 17,7 % vzorcih dihal (Fry in sod., 2011). Ameriški raziskovalci so v kontrolno skupino vključili otroke do 5 let, ki so obiskali zdravstveno ustanovo zaradi splošnega sistematskega pregleda pri osebem zdravniku. V raziskavo so vključili otroke, ki v času obiska niso kazali znakov okužbe dihal. Zbrali so 790 vzorcev dihal, v katerih so dokazali prisotnost rinovirusov v 12,5 % vzorcev dihal (Iwane in sod., 2011). Kontrolno skupino so v svojo raziskavo vključili tudi španski raziskovalci, v katero so uvrstili vzorce dihal otrok, starih do 14 let, hospitaliziranih zaradi operativnega posega ali obolenja spodnjih prebavil ter 10 dni pred hospitalizacijo niso kazali znakov okužbe dihal. Vključili so 211 vzorcev ter dokazali prisotnost rinovirusov v 17,5 % vzorcih dihal (Calvo in sod., 2009). V vseh raziskavah so prisotnost rinovirusov potrdili z uporabo enake molekularne metode, kot pri določanju rinovirusov v vzorcih pediatričnih bolnikov.

V naši raziskavi smo določali genotipe rinovirusov na podlagi 390 bp dolgega nukleotidnega zaporedje dela regije 5' NCR. Gre za visoko ohranjeno regijo s katero zanesljivo potrdimo prisotnost rinovirusov, vendar je manj primerna za določanje vrst rinovirusov, predvsem zaradi domnevnih rekombinacij med sevi rinovirusov A in C znotraj te ohranjene regije.

Zanesljivejša je klasifikacija rinovirusov na podlagi regij VP4/VP2 in VP1 (Arden in Mackay, 2010). Veliko raziskav je bilo izvedenih v kombinaciji z regijo 5' NCR in VP4/VP2, VP1 ali VP2 regijo (Han in sod., 2009; Fry in sod., 2011; Iwane in sod., 2011; Miller in sod., 2009b; Calvo in sod., 2011).

Na podlagi rezultatov naše raziskave smo ugotovili, da v skupini bolnih otrok najpogosteje povzročajo okužbe rinovirusi vrste A (56,8 %), sledijo jim rinovirusi vrste C (37 %) in rinovirusi vrste B (4,9 %), ki redko povzročajo okužbe dihal pri pediatričnih bolnikih z okužbo spodnjih dihal. V enem primeru (1,2 %) smo kot povzročitelja okužbe spodnjih dihal dokazali enterovirus. V skupini hudo bolnih otrok smo dokazali večji delež rinovirusov vrste C (57,9 %) kot vrste A (42,1 %), medtem ko rinovirusov vrste B nismo dokazali.

Iz teh podatkov sklepamo, da rinovirusi vrste C pogosteje povzročajo okužbe spodnjih dihal ter jih posledično povezujemo z večjo virulentnostjo. Slednjega ne moremo potrditi s primerjavo rezultatov drugih raziskav, saj pediatričnih bolnikov v nobenem primeru niso razdelili v skupino bolnih in hudo bolnih otrok. Prav tako moramo upoštevati možnost nepravilnega uvrščanja rinovirusov v skupine A, B in C, saj klasifikacija rinovirusov v skupine na podlagi regije 5' NCR HRV ni zanesljiva. Tajski raziskovalci so edini, ki so v vzorcih dihal pediatričnih bolnikov najpogosteje dokazali rinoviruse vrste C (51 %), sledili so rinovirusi vrste A (43 %) in rinovirusi vrste B (6 %). Pri tem lahko upoštevamo možnost, da so bili pediatrični bolniki v tajski raziskavi hudo bolni, vendar tega podatka raziskovalci niso navedli, zato jih ne moremo primerjati z našo skupino hudo bolnih otrok. Genotipe rinovirusov so določili na podlagi analize VP1 dela genoma. V vzorcih, v katerih na podlagi analize VP1 dela genoma, niso uspeli določiti genotipov rinovirusov, so naknadno izvedli analizo 5' NCR in VP4/VP2 delov genoma rinovirusov ter tako določili majkajoče genotipe (Fry in sod., 2011). Ameriški raziskovalci so nukleotidna zaporedja rinovirusov pridobili na podlagi analize VP1 dela genoma. Vzorce dihal, kjer nukleotidnih zaporedij niso uspeli določiti, so ponovno analizirali z VP4/VP2 ali 5' NCR delom genoma. V skupini bolnih otrok so okužbe spodnjih dihal najpogosteje povzročali rinovirusi vrste A (51,1%), sledili so jim rinovirusi vrste C (42,1 %) ter rinovirusi vrste B (6,8 %) (Iwane in sod., 2011). Jordanski raziskovalci so ugotovili, da okužbe dihal pri pediatričnih bolnikih najpogosteje povzročajo rinovirusi vrste A (65,5 %), sledijo jim rinovirusi vrste C (31 %) ter rinovirusi vrste B (3,5 %), ki so jih določili v najmanjšem številu vzorcev. Tako kot ameriški raziskovalci so določili

genotipe rinovirusov na podlagi analize 5' NCR in VP4/VP2 dela genoma rinovirusov. V končnem poročilu so še zabeležili, da so pediatrični bolniki, pri katerih so v vzorcih dihal dokazali prisotnost rinovirusov vrste C, pogosteje potrebovali zdravljenje s kisikom. Na podlagi tega sklepajo, da so rinovirusi vrste C virulentnejša skupina rinovirusov (Miller in sod., 2009b).

O povečani virulentnosti rinovirusov vrste C poročajo tudi Taparrel in sodelavci (2009). V svoji raziskavi opisujejo primer 14-mesečnega dečka, ki je bil sprejet na urgentni oddelek zaradi povišane telesne temperature in klinično sliko okužbe spodnjih dihal, ki je kasneje napredovala v vnetje osrčnika (perikarditis). Vzorci pridobljeni z bronhoalveolarno lavažo (BAL) in vzorci perikardialne tekočine so bili negativni na prisotnost bakterij in gliv. Analiza regije 5' NCR in VP1 je potrdila okužbo z rinovirusi vrste C. Kljub nizkem virusnem bremenu so dokazali prisotnost virusne RNA v perikardialni tekočini, krvi ter v spodnjih prebavilih. Raziskovalci sumijo na pojav viremije, vendar je prav tako možno, da se je virus razširil v omenjene dele telesa iz spodnjih dihal (Taparrel in sod., 2009).

Nukleotidna zaporedja v kontrolni skupini zdravih otrok smo določili na enak način kot pri pediatričnih bolnikih ter najpogosteje dokazali prisotnost rinovirusov vrste A (75 %) ter redkeje rinoviruse vrste B (18,8 %) in C (6,2 %). V ostalih raziskavah po svetu so raziskovalci vzorce dihal v kontrolnih skupinah analizirali na enak način kot pri pediatričnih bolnikih. Tajski raziskovalci pri analizi nukleotidnih zaporedij v kontrolni skupini niso oblikovali starostnih skupin kot v skupini bolnikov. V vzorcih zdravih posameznikov vseh starostnih skupin so dokazali največ rinovirusov vrste A (44 %), sledili so rinovirusi vrste C (36 %) in rinovirusi vrste B (20 %). Na podlagi teh rezultatov ne moremo prikazati deleža posameznih vrst rinovirusov, ki se pojavljajo pri tajskih otrocih brez znakov okužb spodnjih dihal (Fry in sod., 2011). Podobne rezultate navajajo tudi ameriški in španski raziskovalci, saj so v kontrolni skupini otrok dokazali največjo prisotnost rinovirusov vrste A (59,1 % in 57,1 %) ter manjšo prisotnost rinovirusov vrste C (36,4 % in 28,6 %) in rinovirusov vrste B (4,5 % in 14,3 %) (Iwane in sod., 2011; Calvo in sod., 2009).

Tajski in Kitajski raziskovalci v svojih raziskavah poročajo o različnih deležih rinovirusnih skupin, glede na velikost skupine preiskovancev. V obeh državah so v obdobju dveh let izvedli dve ločeni raziskavi o epidemiologiji rinovirusov pri otrocih (Linsuwanon in sod.,

2009; Renwick in sod., 2011; Lau in sod., 2007; Lau in sod., 2009) ter prišli do zaključka, da v kolikor v raziskavo vključimo manjšo skupino preiskovancev, v vzorcih dihal dokažemo značilno višji delež rinovirusov vrste C kot vrste A, medtem, ko v večji skupini preiskovancev v vzorcih dihal dokažemo značilno večje število rinovirusov vrste A kot vrste C.

V sklopu magistrskega dela smo analizirali pogostnost pojavljanja rinovirusnih okužb, ki smo jih dokazali v vzorcih bolnih in hudo bolnih otrok ter zdravih otrok. Rinovirusi vrste C, ki smo jih dokazali v vzorcih dihal bolnih in hudo bolnih pediatričnih bolnikov, kažejo na največjo pogostnost pojavljanja v spomladanskih mesecih, kar ne sovпада z rezultati drugih raziskav po svetu, saj le-te poročajo o največji pogostnosti pojavljanja rinovirusov vrste C v jesenskih in zimskih mesecih (Lau in sod., 2009; McErlean in sod., 2007; Miller in sod., 2009b). Epidemiološka slika rinovirusov vrste A kaže na najvišjo pogostnost pojavljanja v jesenskih in zimskih mesecih, kar sovпада z našimi rezultati, saj smo največ rinovirusov vrste A dokazali v zimskih mesecih. Podobna pojavnost velja za rinoviruse vrste B, ki smo jih najpogosteje dokazali v vzorcih dihal otrok, hospitaliziranih v jesenskih mesecih (Lau in sod., 2009). V vzorcih dihal zdravih otrok smo dokazali najvišji delež rinovirusov vrste A, najpogosteje so se pojavljali v jesenskih mesecih.

Cilj magistrskega dela je bil tudi preveriti ali rinovirusi povzročajo okužbe dihal pri otrocih kot edini povzročitelji okužb dihal ali skupaj z drugimi virusnimi povzročitelji okužb dihal. Glede na vedno večje število raziskav, ki potrjujejo patogenost rinovirusov vrste C, smo predvidevali, da v vzorcih dihal v katerih smo dokazali prisotnost rinovirusov vrste C ne bomo dokazali drugih virusnih povzročiteljev. Rinovirusi vrste B redko povzročajo okužbe dihal pri otrocih, zato smo predvidevali, da bomo v vzorcih v katerih smo dokazali prisotnost rinovirusov B dokazali še druge virusne povzročitelje. Huang in sodelavci (2009) so vzorce dihal otrok, v katerih so se pojavile sočasne okužbe z drugimi virusnimi povzročitelji, ločili glede na virusne skupine A, B in C, zato je primerjava naših rezultatov z njihovimi najprimernejša. V raziskavo so vključili pediatrične bolnike, s postavljeno diagnozo bronhilitisa ali pljučnice, vendar niso bili hospitalizirani (Huang in sod., 2009).

V tretjini vzorcev dihal bolnih otrok, v katerih smo dokazali prisotnost rinovirusov vrste C, smo potrdili prisotnost še vsaj enega virusa, ki povzroča okužbe dihal ter dokazali sočasno okužbo s človeškim bokavirusom (HBoV), respiratornim sincicijskim virusom (RSV) in

adenovirusom (AdV). Sočasno okužbo z dvema različnima virusnima povzročiteljema smo dokazali le v enem primeru (HRV-C/RSV/HBoV). Podobne rezultate navajajo Huang in sodelavci (2009), saj so v tretjini vzorcev dihal, v katerih so dokazali prisotnost rinovirusa vrste C, sočasne okužbe prav tako najpogosteje povzročali respiratorni sincicijski virus (RSV), človeški bokavirus (HBoV) in adenovirus (AdV). Sočasno okužbo z dvema različnima virusnima povzročiteljema so dokazali v treh vzorcih dihal (HRV-C/RSV/FluA, HRV-C/RSV/AdV, HRV-C/RSV-HBoV) (Huang in sod., 2009).

V skupini rinovirusov vrste A smo poleg rinovirusov dokazali prisotnost več različnih virusnih povzročiteljev okužb dihal. Najpogosteje smo dokazali respiratorni sincicijski virus (RSV), človeški bokavirus (HBoV) ter adenovirus (AdV) in virus parainfluence (PIV). Ugotovili smo, da človeški bokavirusi (HBoV) pogosto povzročajo okužbe dihal pri otrocih, saj smo jih dokazali v vseh primerih, ko smo v vzorcih dihal, poleg rinovirusov dokazali še dva različna virusna povzročitelja. Dokazali smo še respiratorni sincicijski viruso (RSV) in človeški bokavirus (HBoV) ter redkeje adenovirus (AdV) in virus parainfluence (PIV), ki jih prav tako uvrščamo med pomembnejše povzročitelje okužb dihal pri otrocih. V sklopu naše raziskave smo v tej skupini rinovirusov dokazali sočasne okužbe v več kot tretjini vzorcev dihal, medtem, ko so Huang in sodelavci (2009) v tej skupini rinovirusov dokazali manj kot tretjino sočasnih okužb z drugimi virusi. Najpogosteje so dokazali virus parainfluence tipa 1 (PIV1) ter človeški bokavirus (HBoV). Sočasnih okužb z več kot enim povzročiteljem okužb dihal v tej skupini rinovirusov niso dokazali (Huang in sod., 2009). V naši raziskavi smo v nekaterih vzorcih dihal poleg rinovirusa dokazali tudi po dva druga virusna povzročitelja okužb dihal.

V vseh štirih vzorcih dihal bolnih otrok, v katerih smo dokazali prisotnost rinovirusov vrste B, smo dokazali prisotnost še vsaj enega virusnega povzročitelja okužb dihal. V vzorcih smo potrdili prisotnost respiratornega sincicijskega virusa (RSV) ter človeški bokavirus (HBoV). V enem primeru smo dokazali sočasno okužbo z dvema virusoma (HRV-B/HBoV/RSV). Tako smo potrdili domnevo, da rinovirusi vrste B sami redko povzročajo okužbe dihal pri otrocih. Huang in sodelavci (2009) o sočasnih okužbah, z več kot enim virusom, v tej skupini rinovirusov ne poročajo. Sočasno okužbo so potrdili v več kot tretjini vzorcev in potrdili prisotnost respiratornega sincicijskega virusa (RSV) ter človeški enterovirus (EV) (Huang in sod., 2009).

V naši skupini hudo bolnih otrok so rinovirusi edini, ki povzročajo okužbe dihal pri pediatričnih bolnikih.

V vzorcih dihal zdravih otrok, v katerih smo dokazali prisotnost rinovirusov vrste A, smo potrdili sočasno okužbo z adenovirusi (AdV) ter sočasne okužbe z več kot enim virusnim povzročiteljem okužb dihal. Na podlagi tega sklepamo, da so bili virusi v vzorcih dihal prisotni, vendar niso povzročili okužbe, saj so bili zastopani v nizkih količinah. Slednje potrjujejo visoke vrednosti Ct (angl. threshold cycle), ki so se v povprečju gibale okoli 30. V vzorcih dihal zdravih otrok, kjer smo dokazali prisotnost rinovirusov vrste B in C sočasnih okužb nismo potrdili. Trenutno ni dostopne literature v kateri so raziskovalci analizirali pojav sočasnih okužb v vzorcih dihal zdravih otrok. Posledično naše rezultate težko primerjamo z rezultati drugih raziskav.

6 SKLEPI

- V raziskavo smo vključili vzorce dihal, ki so pripadali otrokom starim do 72 mesecev in so bili hospitalizirani na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja ter na Klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo.
- Na podlagi zdravstvenega stanja smo otroke razdelili v tri skupine: skupina bolnih otrok s postavljeno diagnozo bronhiolitisa, skupina hudo bolnih otrok s težko potekajočo okužbo spodnjih dihal ter skupina zdravih otrok, brez simptomov okužbe dihal, ki je služila kot kontrolna skupina.
- V vzorcih dihal bolnih in hudo bolnih otrok smo z metodo RT-PCR v realnem času dokazali približno enak delež rinovirusov (27,2 % in 28,8 %), medtem ko smo v vzorcih dihal zdravih otrok dokazali nižji delež rinovirusov (10,9 %).
- V skupini bolnih in zdravih otrok povzročajo največ okužb rinovirusi vrste A (56,8 % in 75 %), medtem ko v skupini hudo bolnih otrok rinovirusi vrste C (57,9 %).
- Rinovirusi vrste B zelo redko povzročajo okužbe dihal pri otrocih.
- V skupini bolnih in hudo bolnih otrok rinovirusi vrste C najpogosteje povzročajo okužbe dihal v jesenskih mesecih, medtem ko rinovirusi vrste A in B v jesenskih in zimskih mesecih.
- V skupini zdravih otrok najpogosteje povzročajo okužbe dihal rinovirusi vrste A, in sicer v jesenskih mesecih.
- Največ sočasnih okužb smo dokazali v vzorcih dihal bolnih otrok, kjer so skupaj z rinovirusi okužbe dihal najpogosteje povzročali respiratorni sincicijski virusi in človeški bokavirusi.
- V vzorcih dihal hudo bolnih otrok so bili rinovirusi edini povzročitelji okužb dihal.
- Rinovirusi vrste B, v primerjavi z rinovirusi vrste A in C, pogosteje povzročajo okužbe dihal skupaj z drugimi virusnimi povzročitelji okužb dihal.

7 POVZETEK

Prehlad je akutna virusna okužba, ki se pojavlja pri vseh starostnih skupinah. Klinični znaki se kažejo v obliki kašlja, vnetega grla, nosnega izcedka in glavobola. V želji po odkritju povzročiteljev prehlada, so raziskovalci v petdesetih letih dvajsetega stoletja odkrili novo skupino virusov, ki so jo poimenovali rinovirusi. Rinovirusi se pojavljajo po vsem svetu in povzročajo okužbe dihal skozi celo leto. So majhni RNA virusi, ki jih uvrščamo v družino *Picornaviridae*. V osnovi jih razdelimo na dve taksonomski skupini: rinovirusi vrste A in B. Razvoj visoko občutljivih molekularnih metod je omogočil odkritje nove skupine rinovirusov, ki jo imenujemo rinovirusi vrste C ter jo povezujemo z različnimi boleznimi spodnjih dihal, kot so bronhiolitis, pljučnica in astma. Glede na vedno večje število raziskav, v katerih kot glavne povzročitelje okužb spodnjih dihal navajajo rinoviruse, smo v okviru magistrskega dela preverili kateri genotipi človeških rinovirusov povzročajo okužbe spodnjih dihal pri hospitaliziranih otrocih v Sloveniji. V raziskavo smo vključili 549 vzorcev dihal iz raziskave VODP, ki je v obdobju od oktobra 2009 do septembra 2011 potekala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Vzorce dihal smo, glede na zdravstveno stanje otrok, razdelili na tri skupine, in sicer skupina bolnih otrok z diagnozo bronhiolitisa, skupina hudo bolnih otrok s težko potekajočo okužbo spodnjih dihal ter skupina zdravih otrok, ki niso kazali znakov okužbe spodnjih dihal, vendar so bili v enakem obdobju hospitalizirani zaradi elektivnega kirurškega posega. S pomočjo molekularnih metod smo določili delež rinovirusov v vzorcih dihal ter ugotovili, da se v vseh treh skupinah pojavljajo v približno enakem deležu (bolni, 27,2 %; hudo bolni, 28,8 %; zdravi, 10,9 %) . Na podlagi filogenetske analize smo določili genotipe rinovirusov. Ugotovili smo, da v skupini bolnih otrok najpogosteje povzročajo okužbe dihal rinovirusi vrste A (56,8 %), sledijo jim rinovirusi vrste C (37 %) in rinovirusi vrste B (4,9 %). Na začetku raziskave smo postavili hipotezo, da bomo največje število rinovirusov vrste C dokazali v skupini hudo bolnih otrok, saj to skupino rinovirusov vse pogosteje povezujejo z okužbami spodnjih dihal s težjim potekom. Hipotezo smo potrdili, saj smo v vzorcih dihal hudo bolnih otrok dokazali največji delež rinovirusov vrste C (57,9 %) ter manjši delež rinovirusov vrste A (42,1 %). V skupini zdravih otrok rinovirusov vrste C nismo pričakovali, vendar smo jih dokazali v 6,3 %. Največji delež je pripadal rinovirusom vrste A (75 %). Prav tako smo ugotovili, da rinovirusi vrste C redko povzročajo okužbe dihal sočasno z drugimi virusnimi povzročitelji, predvsem v skupini hudo bolnih otrok s težko potekajočo okužbo spodnjih dihal.

8 VIRI

- Amineva S.P., Aminev A.G., Gern J.E., Palmenberg A.C. 2011. Comparison of rhinovirus A infection in human primary epithelial and HeLa cells. *Journal of General Virology*, 92: 2549-2557.
- Anzueto A. 2003. Diagnosis and treatment of rhinovirus respiratory infections. *Chest*, 123: 1664-1672.
- Arden K.E., Mackay I.M. 2010. Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses. *Reviews in Medical Virology*, 20: 156-176.
- Arden K.E., McErlean P., Nissen M.D., Sloots T.P., Mackay I.M. 2006. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses and bocavirus during acute respiratory tract infections. *Journal of Medical Virology*, 78: 1232-1240.
- Arruda E., Boyle T.R., Winther B., Pevear D.C., Gwaltney J.M., Hayden F.G. 1995. Localization of human rhinovirus replication in the upper respiratory tract by *in situ* hybridization. *Journal of Infectious Disease*, 171: 1329-1333.
- Arruda E., Pitkäranta A., Witek T.J., Doyle C.A., Hayden F.G. 1997. Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2864-2868.
- Barret B. 2003. Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review. *Phytomedicine*, 10: 66-86.
- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool. 2013. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: database.
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (Januar 2013)
- Bochkov Y.A., Gern J.E. 2012. Clinical and molecular features of human rhinovirus C. *Microbes and Infection*, 14, 6: 485-494.

- Bochkov Y.A., Palmenberg A.C., Lee W.M., Rathe J.A., Amineva S.P., Sun X., Pasic T.R., Jarjour N.N., Liggett S.B., Gern J.E. 2011. Molecular modeling, organ culture and reverse genetics for a newly identified human rhinovirus C. *Nature Medicine*, 17: 627-632.
- Busse W.W., Gern J.E., Dick E.C. 1997. The role of respiratory viruses in asthma. *Ciba Foundation Symposium*, 206: 208-219.
- Calvo C., Casas I., Garcia-Garcia M.L., Pozo F., Reyes N., Cruz N., Garcia-Cuenllas L., Pérez-Breña P. 2009. Role of rhinovirus C respiratory infectious in sick and healthy children in Spain. *Pediatric Infectious Disease*, 29, 8: 717-720.
- Chan E.Y. 2005. Advances in sequencing technology. *Mutation Research*, 573: 13-40.
- Clementi M., Menzo S., Bagnarelli P., Manzin A., Valenza A., Varaldo P.E. 1993. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *Genome Research*, 2: 191-196.
- Corne J.M., Marshall C., Smith S., Schreiber J., Sanderson G., Holgate S.T., Johnston S.L. 2002. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet*, 359: 831-834.
- Faux C.E., Arden K.E., Lambert S.B., Nissen M.D., Nolan T.M., Chang A.B., Sloots T.P. 2011. Usefulness of published PCR primers of detecting human rhinovirus infection. *Emerging Infectious Disease*, 17: 296-298.
- Fry A.M., Lu X., Olsen S.J., Chittaganpitch M., Sawatwong P., Chantira S., Baggett H.C., Erdman D. 2011. Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander. *PLoS ONE* 6, 3: e17780, doi:10.1371/journal.pone.0017780: 7 str.
- Fuchs R., Blaas D. 2010. Uncoating of human rhinoviruses. *Reviews in Medical Virology*, 20: 281-297.

- Gama R.E., Horsnell P.R., Hughes P.J., North C., Bruce C.B., al-Nakib W., Stanway G. 1989. Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 28: 73-77.
- Gern J.E. 2010. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *Journal of Virology*, 84: 7418-7426.
- Gern J.E., Busse W.W. 1999. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 9-18.
- Gern J.E., Rosenthal L.A., Sorkness R.L., Lemanske R.F., Jr. 2005. Effects of viral respiratory infections on lung development and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115: 668-674.
- Gwaltney J.M., Hendley J.O., Phillips C.D., Mygind N., Winther B. 2000. Nose blowing propels nasal fluid into the paranasal sinuses. *Journal of Clinical Infectious Diseases*, 30: 387-391.
- Han T.H., Chung J.Y., Hwang E.S., Koo J.W. 2009. Detection of human rhinovirus C in children with acute lower respiratory tract infections in South Korea. *Archives of Virology*, 154: 987-991.
- Harvala H., McIntyre C.L., Mcleish N.J., Kondracka J., Palmer J., Molyneux P., Gunson R., Bennett S., Templeton K., Simmonds P. 2012. High detection frequency and viral loads of human rhinovirus species A to C in fecal samples; diagnostic and clinical implications. *Journal of Medical Virology*, 84: 536-542.
- Hernes S., Quarsten H., Hagen E., Lyngrouth A., Pripp A., Bjorvatn B., Bakke P. 2011. Swabbing for respiratory viral infections in older patients: a comparison of rayon and nylon flocked swabs. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30: 159-165.

- Huang T., Wang W., Bessaud M., Ren P., Sheng J., Yan H., Zhang J., Lin X., Wang Y., Delpeyroux F., Deubel V. 2009. Evidence of recombination and genetic diversity in human rhinoviruses in children with acute respiratory infection. *PLoS ONE* 4, 7: e6355, doi:10.1371/journal.pone.0006355: 13 str.
- Iwane M.K., Prill M.M., Lu X., Miller E.K., Edwards K.M., Hall C.B., Griffin M.R., Staat M.A., Anderson L.J., Williams J.V., Weinberg G.A., Ali A., Szilagyi P.G., Zhu Y., Erdman D.D. 2011. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *Journal of Infectious Diseases*, 204: 1702-1710.
- Jacobs S.E., Lamson D.M., George K.S., Walsh T.J. 2013. Human rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 1: 135-162.
- Khetsuriani N., Lu X., Teague W.G., Kazerouni N., Anderson L.J., Erdman D.D. 2008. Novel human rhinoviruses and exacerbation of asthma in children. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 1793-1796.
- Lamson D., Renwick N., Kapoor V., Liu Z., Palacios G., Ju J., Dean A., St George K., Brieseman T., Lipkin W.I. 2006. MassTag polymerase-chain reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005. *Journal of Infectious Diseases*, 194:1389-1402.
- Lau S.K.P., Yip C.C.Y., Lin A.W.C., Lee R.A., So L., Lau Y., Chan K., Woo P.C.Y., Yuen K. 2009. Clinical and molecular epidemiology of human rhinovirus C in children and adults in Hong Kong reveals a possible distinct human rhinovirus C subgroup. *Journal of Infectious Diseases*, 200: 1096-1103.
- Lau S.K.P., Yip C.C.Y., Tsoi H., Lee R.A., So L., Lau Y., Chan K., Woo P.C.Y., Yuen K. 2007. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C associated with acute respiratory illness in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 3655-3664.

- Lau S.K., Yip C.C., Woo P.C., Yuen K.Y. 2010. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species. *Emerging Health Threats Journal*, 3: e2, doi: 10.3134/ehth.10.002: 34 str.
- Linsuwanon P., Payungporn S., Samransamruajkit R., Posuwan N., Makkoch J., Theanboonlers A., Poovorawan Y. 2009. High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *Journal of Infection*, 59: 115-121.
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190-212.
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6: 1292-1305.
- McErlean P., Shackelton L.A., Andrews E., Webster D.R., Lambert S.B., Nissen M.D., Sloots T.P., Mackay I.M. 2008. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). *PLoS ONE* 3, 4: e1847, doi:10.1371/journal.pone.0001847: 12 str.
- McErlean P., Shackelton L.A., Lambert S.B., Nissen M.D., Sloots T.P., Mackay I.M. 2007. Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-Qpm, discovered in infants with bronchiolitis. *Journal of Clinical Virology*, 39: 67-75.
- Midulla F., Pierangeli A., Cangiano G., Bonci E., Salvadei S., Scagnolari C., Moretti C., Antonelli G., Ferro V., Papoff P. 2012. Rhinovirus bronchiolitis and recurrent wheezing: 1-year follow up. *European Respiratory Journal*, 39: 396-402.
- Miller E.K., Edwards K.M., Iwane M.K., Griffin M.R., Hall C.B., Weinberg G.A., Zhu Y., Szilagyi P.G., Morin Laura-Lee, Lu X, Williams J.V. 2009a. A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123: 98-104.e1

- Miller E.K., Khuri-Bulos N., Williams J.V., Shebabi A.A., Faouri S., Jundi I.A., Chen Q., Heil L., Mohamed Y., Morin L.L., Ali A., Halasa N.B. 2009b. Human rhinovirus C associated with wheezing in hospitalized children in the Middle East. *Journal of Clinical Virology*, 46: 85-89.
- Niubo J., Perez J.L., Carvajal A., Ardanuy C., Martin R. 1994. Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1119-1120.
- Novick S.G., Godfrey J.C., Godfrey N.J., Wilder H.R. 1996. How does zinc modify the common cold? Clinical observations and implications regarding mechanisms of action. *Medical Hypotheses*, 46: 295-302.
- Palmenberg A.C., Rathe J.A., Liggett S.B. 2010. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: 1190-1201.
- Palmenberg A.C., Spiro D., Kuzmickas R., Wang S., Djikeng A., Rathe J.A., Fraser-Liggett C.M., Liggett S.B. 2009. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genome reveals structure and evolution. *Science*, 324: 55-59.
- Papadopoulos N.G., Bates P.J., Bardin P.G., Papi A., Lier S.H., Fraenkel D.J., Meyer J., Lackie P.M., Sanderson G., Holgate S.T., Johnston S.L. 2000. Rhinovirus infect the lower airways. *Journal of Infectious Disease*, 181: 1875-1884.
- Pappas D.E., Hendley J.O., Hayden F.G., Winther B. 2008. Symptom profile of common colds in school-aged children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 27: 8-11.
- Peltola V., Warris M., Österback R., Susi P., Hyypiä T., Ruuskanen O. 2008. Clinical effects of rhinovirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 43: 411-414.
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400.

- Renois F., Bouin A., Andreoletti L. 2013. Enterovirus 68 in pediatric patients hospitalized for acute airway disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 2: 640-643.
- Renwick N., Schweiger B., Kapoor V., Liu Z., Villari J., Bullmann R. 2007. A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany. *Journal of Infectious Diseases*, 196: 1754-1760.
- Rohde G.G.U. 2011. Rhinoviruses vaccination: the case in favour. *European Respiratory Journal*, 34: 3-4.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *The Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 74: 5463-5467.
- Savolainen-Kopra C., Blomqvist S., Kilpi T., Roivanen M., Hovi T. 2009. Novel species of human rhinoviruses in acute otitis media. *Pediatric Infectious Disease*, 28: 59-61.
- Scheltinga S.A., Templeton K.E., Beersma M.F.C., Claas E.C.J. 2005. 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.
- Schiebler M., Yerly S., Vieille G., Turin L., Kaiser L., Tapparel C. 2012. Critical analysis of rhinovirus RNA load quantification by real-time reverse transcription - PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 2868-2872.
- Seme K., Poljak M. 1996. Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo – nova metoda za spremljanje poteka in zdravljenje virusnih okužb. *Medicinski razgledi*, 35: 59-74.
- Singleton R.J., Bulkow L.R., Miernyk K., DeByle C., Pruitt L., Hummel K.B., Bruden D., Englund J.A., Anderson L.J., Lucher L., Holman R.C., Hennessy T.W. 2010. Viral respiratory infections in hospitalized and community control children in Alaska. *Journal of Medical Virology*, 82: 1282-1290.

- Singleton P., Sainsbury D. 2001. Dictionary of microbiology and molecular biology. 3rd ed. Chichster, Wiley: 895 str.
- Tapparel C., L'Huillier A.G., Rougemont A.L., Beghetti M., Barazzzone-Argiroffo C., Kaiser L. 2009. Pneumonia and pericarditis in a child with HRV-C infection: a case report. *Journal of Clinical Virology*, 45: 157-60.
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Psychology Education*, 29: 151-159.
- Vesa S., Kleemola M., Blomqvist S., Takala A., Kilpi T., Hovi T. 2001. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatric Infectious Journal*, 20: 574-581.
- Winther B., Greve J.M., Gwaltney J.M., Innes D.J., Eastham J.R., McClelland A., Hendley J.O. 1997. Surface expression of intercellular adhesion molecule 1 on epithelial cells in the human adenoid. *Journal of Infectious Disease*, 176: 523-525.
- Winther B., Gwaltney J.M., Hendley J.O. 1990. Respiratory virus infection of monolayer cultures of human nasal epithelial cells. *American Review of Respiratory Disease*, 141: 839-845.
- Winther B., Gwaltney J.M., Mygind N., Turner R.B., Hendley JO. 1986. Sites of rhinovirus recovery after point inoculation of the upper airways. *JAMA*, 256: 1763-1767.

ZAHVALA

Najprej bi se želela iskreno zahvaliti staršem, ki so me vsa leta študija finančno podpirali in tako omogočili moj študij mikrobiologije ter verjeli vame takrat, ko sem potrebovala vzpodbudne besede. Hvala vam in Špeli za potrpežljivost, vem, da je bilo včasih živeti z menoj zelo stresno.

Posebna zahvala gre mentorju prof. dr. Miroslavu Petrovcu, ki mi je omogočil vstop v svet virologije. Hvala za vse strokovne nasvete in pomoč.

Tina hvala za vse! Ti si imela z menoj največ dela, tako v laboratoriju kot v domačem okolju, saj branje mojega magistrskega dela ni bilo vedno lahko. Brez tvoje pomoči danes ne bi bila tako ponosna na svoj končni izdelek.

Vsem puncam v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij bi se želela zahvaliti za pomoč pri delu in orientaciji v laboratoriju. Pokazale ste mi, da je lahko mikrobiologija tudi zabavna.

Zahvalila bi se tudi Miši in Moniki, ki sta me prav tako potrpežljivo vodili skozi delo v laboratoriju ter veliko pripomogli k nastanku mojega magistrskega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Tatjani Avšič Županc za hiter in strokoven pregled magistrskega dela.

Na koncu bi se želela zahvaliti še vsem sošolcem in prijateljem, ki ste poskrbeli, da sem ohranila študentska leta v najlepšem spominu. Hvala tudi Martinu, ki je bil ob meni v lepih in malo manj lepih trenutkih.

Iskrena hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A: Seznam 87 vzorcev dihal bolnih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. AdV – adenovirus, HRV – rinovirus, HBoV – človeški bokavirus, HCoV – človeški koronavirus, RSV – respiratorni sincicijski virus, PIV – virus parainfluenze.

Št.	Spol	Starost (meseci)	RT-PCR v realnem času	RT-PCR klasika	Nukleotidno zaporedje	Sočasne okužbe
1	Ž	13,4	POZ	POZ	HRV-A-30	
2	M	12,5	POZ	POZ	HRV-A-2	HBoV/AdV
3	M	1,7	POZ	POZ	HRV-C	HBoV
4	M	17,7	POZ	POZ	HRV-A-19	HCoV/RSV/AdV
5	M	18	POZ	POZ	HRV-A-59	HBoV
6	Ž	15,6	POZ	POZ	HRV-A-81	
7	M	19,8	POZ	POZ	HRV-A-2	
8	M	19,6	POZ	POZ	HRV-C	
9	M	27,2	POZ	POZ	HRV-C	
10	M	31	POZ	POZ	HRV-A-66	RSV
11	M	3	POZ	POZ	HRV-C	
12	Ž	6,3	POZ	POZ	HRV-A-2	RSV/HBoV
13	M	4,8	POZ	POZ	HRV-A-66	
14	Ž	6,5	POZ	POZ	HRV-A-49	
15	Ž	13,1	POZ	POZ	HRV-A-18	PIV
16	M	13,3	POZ	POZ	HRV-A-31	
17	M	13,1	POZ	POZ	HRV-C	
18	Ž	14,2	POZ	POZ	HRV-C	
19	Ž	16,1	POZ	POZ	HRV-C	
20	M	16,4	POZ	POZ	HRV-C	RSV
21	M	16,9	POZ	POZ	HRV-A-54	
22	M	17,7	POZ	POZ	HRV-C	
23	M	22,4	POZ	POZ	HRV-C	HBoV
24	M	1,7	POZ	POZ	HRV-C	HBoV
25	M	7,4	POZ	POZ	HRV-C	
26	M	6,6	POZ	POZ	HRV-A-2	
27	M	8,7	POZ	POZ	HRV-A-40	
28	M	8,2	POZ	POZ	HRV-C	HBoV
29	M	8,7	POZ	POZ	HRV-C	
30	M	9,6	POZ	POZ	HRV-C	
31	M	22,2	POZ	POZ	HRV-C	
32	Ž	32,4	POZ	POZ	HRV-A-81	
33	M	9,8	POZ	POZ	HRV-A-31	HBoV/PIV
34	M	11,8	POZ	POZ	HRV-C	
35	M	16,6	POZ	POZ	HRV-A-22	HBoV/PIV
36	Ž	20,8	POZ	POZ	HRV-C	
37	M	24	POZ	POZ	HRV-A-51	

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Seznam 87 vzorcev dihal bolnih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. AdV – adenovirus, HRV – rinovirus, HBoV – človeški bokavirus, HCoV – človeški koronavirus, RSV – respiratorni sincicijski virus, PIV – virus parainfluenze.

Št.	Spol	Starost (meseci)	RT-PCR v realnem času	RT-PCR klasika	Nukleotidno zaporedje	Sočasne okužbe
38	Ž	7,6	POZ	POZ		
39	Ž	9,4	POZ	POZ	EV-68	
40	M	11,9	POZ	POZ	HRV-C	
41	M	12,4	POZ	POZ	HRV-A-76	
42	M	15	POZ	POZ	HRV-A-49	AdV
43	M	22,7	POZ	POZ	HRV-A-1	AdV
44	M	23,6	POZ	POZ	HRV-C	
45	M	24,8	POZ	POZ	HRV-A-1	
46	M	27,5	POZ	POZ	HRV-C	RSV/HBoV
47	M	28,2	POZ	POZ	HRV-A-49	
48	Ž	1,2	POZ	POZ	HRV-A-15	
49	M	11,5	POZ	POZ		
50	Ž	15,4	POZ	POZ	HRV-A-88	
51	M	15,2	POZ	POZ	HRV-A-49	
52	M	22,4	POZ	POZ	HRV-A-9	
53	Ž	22,4	POZ	POZ	HRV-A-9	
54	M	2	POZ	POZ	HRV-B-6	HBoV
55	M	3,8	POZ	POZ	HRV-A-20	HBoV
56	Ž	7,9	POZ	POZ	HRV-C	
57	Ž	21,6	POZ	POZ	HRV-B-3	RSV
58	M	28,5	POZ	POZ		
59	Ž	2,4	POZ	POZ	HRV-B-14	RSV/HBoV
60	M	5,3	POZ	POZ	HRV-A-59	RSV/HBoV
61	Ž	10,4	POZ	POZ	HRV-A-56	
62	M	10,6	POZ	POZ	HRV-A-57	HBoV
63	M	11,6	POZ	POZ	HRV-A-56	
64	M	11,8	POZ	POZ	HRV-A-56	RSV
65	M	13	POZ	POZ	HRV-A-56	RSV
66	M	14,2	POZ	POZ	HRV-A-59	PIV
67	Ž	16,3	POZ	POZ	HRV-A-12	
68	M	17,1	POZ	POZ	HRV-C	AdV
69	M	20,3	POZ	POZ	HRV-A-59	RSV
70	M	29,4	POZ	POZ	HRV-C	
71	M	33,2	POZ	POZ	HRV-C	RSV
72	M	3,4	POZ	POZ	HRV-C	RSV
73	M	3,4	POZ	POZ	HRV-B-6	RSV
74	M	4	POZ	POZ	HRV-A-59	
75	M	4,1	POZ	POZ	HRV-A-56	RSV

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Seznam 87 vzorcev dihal bolnih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. AdV – adenovirus, HRV – rinovirus, HBoV – človeški bokavirus, HCoV – človeški koronavirus, RSV – respiratorni sincicijski virus, PIV – virus parainfluenze.

Št.	Spol	Starost (meseci)	RT-PCR v realnem času	RT-PCR klasika	Nukleotidno zaporedje	Sočasne okužbe
76	Ž	18,7	POZ	POZ	HRV-A-12	
77	Ž	23,4	POZ	POZ	HRV-C	AdV
78	M	4,3	POZ	POZ	HRV-C	
79	M	6,6	POZ	POZ	HRV-A-65	
80	M	31,9	POZ	POZ	HRV-C	
81	Ž	13,3	POZ	POZ	HRV-A-89	
82	M	24,8	POZ	POZ	HRV-A-46	
83	M	14,3	POZ	POZ		
84	Ž	14,3	POZ	POZ	HRV-A-65	
85	M	1,9	POZ	POZ	HRV-C	
86	Ž	24,8	POZ	NEG		
87	Ž	21,5	POZ	NEG		

Priloga B: Seznam 19 vzorcev dihal hudo bolnih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. HRV – rinovirus.

Št.	Spol	Starost (meseci)	RT-PCR v realnem času	RT-PCR klasika	Nukleotidno zaporedje	Sočasne okužbe
1	M	1	POZ	POZ	HRV-C	
2	Ž	5	POZ	POZ	HRV-C	
3	M	5	POZ	POZ	HRV-C	
4	Ž	6	POZ	POZ	HRV-C	
5	Ž	7	POZ	POZ	HRV-A-66	
6	Ž	7	POZ	POZ	HRV-C	
7	Ž	8	POZ	POZ	HRV-A-34	
8	Ž	8	POZ	POZ	HRV-A-22	
9	Ž	10	POZ	POZ	HRV-C	
10	M	11	POZ	POZ	HRV-A-15	
11	Ž	12	POZ	POZ	HRV-A-47	
12	M	14	POZ	POZ	HRV-A-66	
13	Ž	21	POZ	POZ	HRV-C	
14	M	25	POZ	POZ	HRV-A-89	
15	Ž	28	POZ	POZ	HRV-A-28	
16	Ž	39	POZ	POZ	HRV-C	
17	Ž	72	POZ	POZ	HRV-C	
18	Ž	72	POZ	POZ	HRV-C	
19	Ž		POZ	POZ	HRV-C	

Priloga C: Seznam 17 vzorcev dihal zdravih otrok v katerih smo z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost HRV. HRV – rinovirus, AdV – adenovirus, PIV – virus parainfluenze, HBoV – človeški bokavirus, HCoV – človeški koronavirus.

Št.	Spol	Starost (meseci)	RT-PCR v realnem času	RT-PCR klasika	Nukleotidno zaporedje	Sočasne okužbe
1	M	53,7	POZ	POZ	HRV-A-56	HBoV/PIV
2	M	12,6	POZ	POZ	HRV-B-3	
3	Ž	42,4	POZ	POZ	HRV-A-59	AdV
4	M	35,5	POZ	POZ	HRV-A-40	
5	M	51,6	POZ	POZ	HRV-A-12	HCoV/PIV
6	M	57,8	POZ	POZ	HRV-A-81	
7	M	62,4	POZ	POZ	HRV-C	
8	M	18	POZ	POZ	HRV-A-78	HCoV/PIV/AdV
9	M	27,8	POZ	POZ	HRV-A-57	
10	M	28,4	POZ	POZ	HRV-B-52	
11	M	14,2	POZ	POZ	HRV-A-21	AdV
12	M	31,4	POZ	POZ	HRV-A-38	
13	M	1,5	POZ	POZ	HRV-A-28	
14	M	70,4	POZ	POZ	HRV-B-3	
15	Ž	14,1	POZ	POZ	HRV-A-28	
16	M	36,6	POZ	POZ	HRV-A-28	
17	M	27,2	POZ	POZ		