

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA ISLAMOVIĆ

**DOKAZOVANJE IN TIPIZACIJA KORONAVIRUSOV Z VERIŽNO REAKCIJO
S POLIMERAZO**

**DETECTION AND TYPISATION OF CORONAVIRUS WITH POLYMERASE
CHAIN REACTION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Praktično delo za diplomsko nalogu sem opravljala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij v Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem delavcem v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij v Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki so mi pomagali pri praktičnem delu v laboratoriju. Posebna zahvala doc. dr. Miroslavu Petrovcu, ki mi je omogočil izvedbo diplomske naloge, me odlično usmerjal skozi njeno nastajanje in ves čas vzpodbujal.

Ne smem pozabiti tudi na vse svoje bližnje, ki sem jim hvaležna za podporo in razumevanje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogu samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1 RED <i>NIDOVIRALES</i>	2
1.2 ODKRITJE KORONAVIRUSOV	4
1.3 TAKSONOMIJA.....	5
1.4 BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO KORONAVIRUSI.....	5
1.4.1 Sindrom akutnega oteženega dihanja	6
1.4.2 Krup	7
1.4.3 Kawasakijeva bolezen	7
1.5 ZGRADBA VIRIONA	8
1.5.1 Struktурне beljakovine	8
1.5.1.1 S beljakovina	8
1.5.1.2 M beljakovina	8
1.5.1.3 E beljakovina	8
1.5.1.4 HE beljakovina	9
1.5.1.5 Nukleokapsidna beljakovina	9
1.5.2 Replikacijske beljakovine	9
1.5.3 Genom	10
1.6 VIRUSNI ŽIVLJENJSKI CIKEL	11
1.7 REKOMBINACIJA KORONAVIRUSOV.....	13
1.8 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO – TEORETIČNE OSNOVE	14
1.8.1 PCR v realnem času	15
1.9 DOLOČANJE KORONAVIRUSOV	20
2. NAMEN DELA	21
3. MATERIALI IN METODE	22
3.1 VZORCI	22
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE	22
3.3 REAGENTI ZA IZOLACIJO RNA	23
3.4 REAGENTI ZA REAKCIJO RT-PCR	23

3.5 DIREKTNA IMUNOFLUORESCENCA.....	24
3.6 IZOLACIJA RNA	24
3.7 DOLOČANJE KORONAVIRUSOV Z ENOSTOPENJSKO METODO RT-PCR V REALNEM ČASU	26
3.7.1 Kontrole.....	26
3.7.2 Oligonukleotidni začetniki	26
3.7.3 Sonde.....	27
3.7.4 Presejalni PCR.....	27
3.7.5 Tipizacija	28
4. REZULTATI.....	30
4.1 VZORCI	30
4.2 REZULTATI PRESEJALNEGA RT-PCR	31
4.3 REZULTATI TIPIZACIJE.....	32
4.4 KOINFEKCIJE.....	33
5. RAZPRAVA.....	35
6. SKLEP	38
VIRI	39
PRILOGE.....	46

POVZETEK

Virusi so zelo pogost povzročitelj okužb dihal, predvsem pri otrocih. Klinične značilnosti teh okužb so zlahka prepoznavne, toda vzrok pogosto ostane neznan, saj za približno 60 % okužb dihal povzročitelja ne poznamo. Od leta 2002 naprej, ko je na Kitajskem izbruhnili SARS, se je zanimanje za koronaviruse močno povečalo, posledica tega pa je bilo tudi odkritje dveh novih tipov (NL63 in HKU1), poleg že prej znanih (229E in OC43). Danes vemo, da koronavirusi na splošno povzročajo okužbe zgornjih dihal, pri določenih populacijah tudi okužbe spodnjih dihal.

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti, ali se koronavirusi pojavljajo tudi v Sloveniji. Vzorce dihal smo izbrali naključno, v obdobju od začetka januarja do konca marca 2007. Uporabili smo metodo verižne reakcije s polimerazo z obratno transkriptazo v realnem času.

Koronaviruse smo dokazali pri 21 od 160 pregledanih vzorcev (13,1 %). Pri 2 vzorcih smo dokazali tip OC43 (9,5 %), pri 6 tip NL63 (28,6 %) in pri 6 tip HKU1 (28,6 %). Tipa 229E nismo dokazali v nobenem vzorcu. V 7 primerih s tipizacijsko PCR reakcijo nismo dokazali nobenega od naštetih tipov koronavirusa (33,3 %). Pojavljanje koronavirusov smo ugotovili v vseh treh mesecih, največ pozitivnih vzorcev je bilo februarja, največji odstotek prekuženih vzorcev pa januarja. Koinfekcije z drugimi vrstami virusov smo ugotovili pri 42,9 % pozitivnih preiskovancev, največ je bilo okuženih z respiratornim sincicijskim virusom.

ABSTRACT

Viruses are a common cause of infections of respiratory organs, especially with children. Clinical features of such infections are easily recognisable, yet the cause often remains unidentifiable, since approximately 60% of all infections of respiratory organs have no known inducer. Since the year 2002, following the outbreak of SARS virus in China, there has been an increased interest in coronaviruses, which led to the discovery of two new types (NL63 and HKU1). Previously known types were 229E in OC43. Today, it is a well known fact that coronaviruses mainly cause upper respiratory illness and occasionally lower tract disease in susceptible populations.

This thesis paper aims to determine whether coronaviruses also occur in Slovenia. Samples of respiratory organs were chosen randomly in the period between January and through March 2007. The method employed was to use subtype-specific real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays.

The presence of coronaviruses was proven in 21 out of 160 checked samples (13.1%). 2 samples were positive for subtype OC43 (9.5%), 6 were positive for subtype NL63 (28.6%), and another 6 were positive for subtype HKU1 (28.6%). None of the samples were positive for subtype 229E. 7 samples showed, with the use of typified PCR reaction, no trace of any of the aforementioned types (33.3%). The occurrence of coronaviruses was established for the duration of the entire three months, with most positive samples in February and the highest percentage of infected samples in January. Coinfections were found in 42.9% of positive samples, most having been coinfected with the respiratory syncytial virus.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACE:	angiotenzin konvertaza
DIF:	direktna imunofluorescanca
FRET:	prenos fluorescentne resonančne energije
HCoV:	človeški koronavirus
HE:	hemaglutinin esteraza
ORF:	odprt bralni okvir
PCR:	verižna reakcija s polimerazo
RSV:	respiratorni sincicijski virus
RT:	obratna transkriptaza
SARS:	sindrom akutnega oteženega dihanja
TRS:	transkripcijsko regulatorno zaporedje
UTR:	netranslacijsko zaporedje

1. UVOD

Okužbe dihal so danes eden vodilnih vzrokov za obolenost, smrtnost populacije in ekonomske izgube (1). Večina teh okužb se pojavi pozimi in so ponavadi virusnega izvora (2). Pri ljudeh okužbe večinoma povzročajo virusi z RNA (3). Pri sicer zdravem odraslem človeku se ponavadi končajo same od sebe, vseeno pa povzročajo izgubo produktivnega časa. Velik problem predstavljajo okužbe dihal pri rizičnih populacijah, saj so pomemben vzrok za obolenost in smrt zelo majhnih otrok, imunsko oslabljenih bolnikov in starostnikov (1).

Najpogostejši virusi, ki povzročajo akutne okužbe dihal, so respiratorni sincicijski virus (RSV), virusi influence tipa A, B in C, virusi parainfluenca 1, 2, 3 in 4 (PIV), adenovirus (AdV), humani rinovirus (HRV), humani koronavirus (HCoV) in humani metapneumovirus (hMPV). Respiratorni sincicijski virus je glavni vzrok za virusno okužbo spodnjih dihal pri otrocih, še posebej v starosti do enega leta (4). Praktično vsi otroci razvijejo protitelesa proti RSV do tretjega leta starosti (5). Rinovirusi in koronavirusi pa so najpogostejši vzrok za navadni prehlad (6, 7).

Medtem ko so klinične značilnosti okužb dihal zlahka prepoznavne, vzrok za bolezen pogosto ostane neznan (8). Respiratorni sincicijski virus, virus parainfluence 1, 2 in 3, virusa influence A in B ter humani adenovirus so osnovne diagnostične tarče pri laboratorijskih preiskavah akutnih okužb dihal. Če tem virusom dodamo še običajne bakterijske patogene, ki okužijo dihala, so vsi vzrok le za 30–60 % okužb dihal. Zato moramo vsako poročilo o na novo odkritih virusih, ki so povezani s takimi okužbami, vzeti resno in te viruse raziskovati (3).

Z razvojem molekularnih metod so odkrili številne, prej neznane respiratorne viruse, med katere spadajo humani metapneumovirus, humani koronavirus NL63 in HKU1 in humani bokavirus. Podatki iz številnih raziskav kažejo, da so ti virusi vsaj delno odgovorni za bolezni dihal, katerih povzročitelja prej nismo poznali (8).

Praktično vsi respiratorni virusi povzročajo zelo podobne bolezenske spremembe, od faringitisa (vnetje sluznice žrela), laringitisa (vnetje grla), bronhitisa (vnetje sluznice

bronhusov), traheitisa (vnetje sapnika) do bronhiolitisa (vnetje bronhiolov) in pljučnice. Okužba se ponavadi začne z nosnim izcedkom, kašljem in včasih vročino. Po dnevnu ali dveh se lahko prenese na spodnja dihala z znaki dihalne stiske. Življenjsko ogrožajoča apnea (začasno prenehanje dihanja) se lahko pojavi pri zelo majhnih dojenčkih, še posebej pri okužbah z respiratornim sincicijskim virusom (5).

Veliko je rizičnih skupin, pri katerih lahko pride do resnih okužb spodnjih dihal, še posebej pri okužbah z RSV. Te skupine so prezgodaj rojeni otroci, bolniki s kronično pljučno boleznijo ali cistično fibrozo, bolniki s kongenitalno srčno boleznijo in imunsko oslabljeni bolniki (5).

Določanje virusnega antiga z imuno-fluorescenčnimi ali imuno-encimskimi metodami je danes najpogosteje uporabljeni metoda za odkrivanje respiratornih virusov. Tehniki sta hitri in cenovno ugodni, vendar sta slabše občutljivi in imata omejene možnosti odkrivanja zaradi velikega števila tipov virusov, ki povzročajo okužbe dihal (9). Z metodo direktne imunofluorescence običajno odkrivamo le sedem tipov virusov: virusa influence A in B, viruse parainfluenca 1, 2 in 3, respiratorični sincicijski virus in adenovirus.

Izolacija virusa je povezana s prepoznavanjem virusnega antiga, vendar moramo izbrati pravo celično kulturo, ta mora omogočiti rast virusa, ki ga želimo osamiti (9).

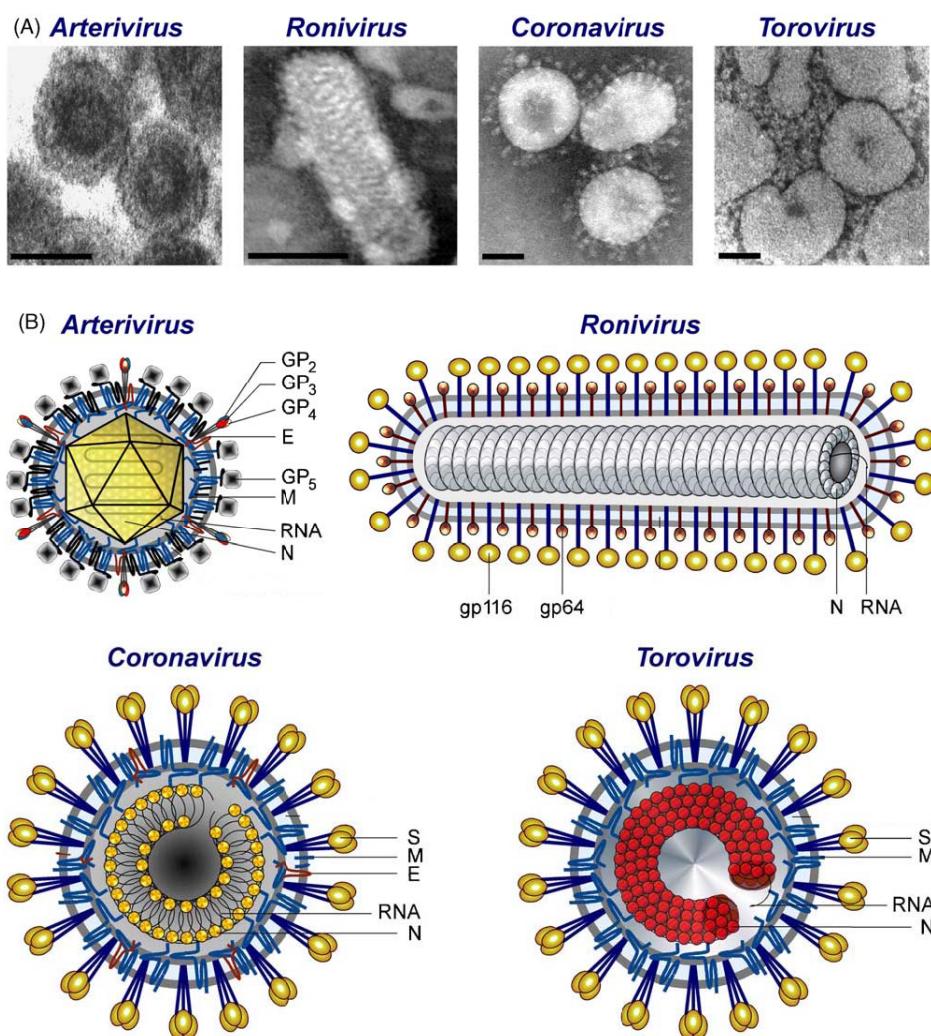
Odkrivanje respiratornih virusov se je občutno izboljšalo z uporabo molekularnih metod, kot je na primer verižna reakcija s polimerazo (PCR).

1.1 RED NIDOVIRALES

Virusi RNA so razvili izjemno raznolike genome in replikacijske mehanizme (10). Delimo jih na 4 razrede glede na genom, od razreda III do razreda VI. Razreda I in II pripadata DNA virusom (11). Med vsemi štirimi razredi RNA virusov le razred s pozitivno polarno enovijačno RNA, kamor spada tudi red *Nidovirales*, izkorišča svoj celotni genom (10).

Red *Nidovirales* tvorijo tri družine: *Coronaviridae*, *Arteriviridae* in *Roniviridae*. Družina *Coronaviridae* se deli še na dva rodu *Coronavirus* in *Torovirus*, v družino *Roniviridae* spada rod *Okavirus* in v družino *Arteriviridae* rod *Arterivirus* (12, 13).

Velikost genoma je pri posameznih družinah precej različna, od 12,7 kb pri družini *Arteriviridae* do 31,3 kb pri *Coronaviridae* in *Roniviridae* (13). Če bi vse viruse RNA po velikosti genoma razvrstili od največjega do najmanjšega, bi na vrhu lestvice našli tri sorodne skupine virusov, ki pripadajo redu *Nidovirales*, in sicer koronaviruse, toroviruse in roniviruse. Poleg velikosti genoma se vse skupine nidovirusov razlikujejo tudi po virusni morfologiji, vrsti gostiteljskih celic in še nekaterih drugih bioloških lastnostih. Zaradi vseh razlik imajo tudi različno obliko, čeprav imajo vsi zunanj ovojnicu in membranske beljakovine. Koronavirusi, torovirusi in precej manjši arterivirusi so okrogli, ronivirusi pa imajo paličasto obliko (slika 1) (10).



Slika 1: Prikaz štirih predstavnikov reda *Nidovirales* pod elektronskim mikroskopom (A) in s shematskim prikazom (B) (10)

Nidovirusi spadajo med najbolj kompleksne RNA viruse in molekularna genetika jih jasno loči od drugih virusov RNA (10).

1.2 ODKRITJE KORONAVIRUSOV

Zgodovina humanih koronavirusov sega v leto 1965, ko sta Tyrrell in Bynoe naredila korak naprej pri izolaciji virusov pri bolnikih z navadnim prehladom. Uporabila sta celične kulture, ki sta jih pridobila iz sapnika človeškega zarodka in nosu. Virus B814, ki je bil odkrit na ta način, je pri prostovoljcih povzročil prehlad, sprožil pa je tudi posebno zanimanje, saj je bil občutljiv na eter, rasel pa je le na človeškem ciliarnem epiteliju (14). V približno istem obdobju sta Hamre in Procknow na tkivnih kulturah uspela gojiti virus z nenavadnimi lastnostmi. Vzorce sta dobila od študentov medicine s prehladom. Tudi ta virus, 229, kot ga je poimenovala Hamre, je bil občutljiv na eter. Kasneje so znanstveniki poročali še o drugih na eter občutljivih virusih iz človeških dihal. Označili so jih s črkama OC, kar naj bi pomenilo, da so rasli na kulturah iz organov, imeli pa so podobno morfologijo kot 229E. V poznih šestdesetih letih prejšnjega stoletja so uradno potrdili novo skupino virusov, ki so jo poimenovali koronavirusi (15).

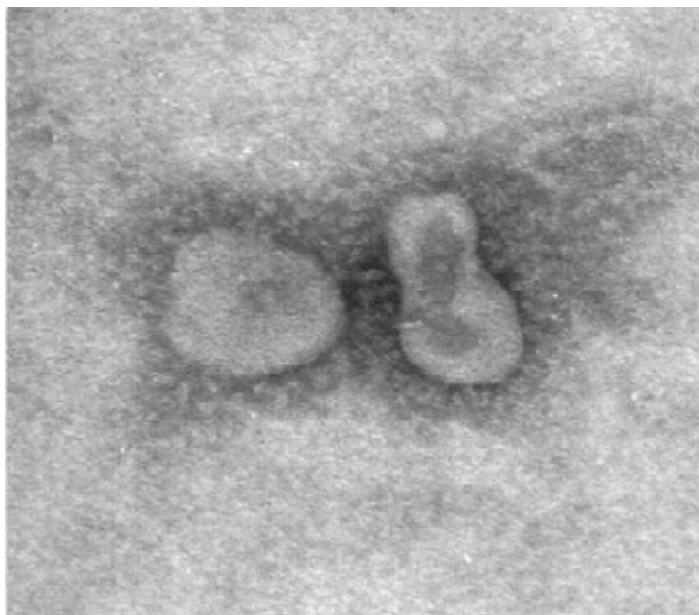
Dolgo časa je veljalo, da koronavirusi povzročajo le blage okužbe dihal v obliki prehlada, le redko pa okužbe spodnjih dihal. To mišljenje se je bistveno spremenilo leta 2002, ko se je na jugu Kitajske pojavil nov humani koronavirus, ki povzroča sindrom akutnega oteženega dihanja SARS. Raziskave so pokazale, da so netopirji najverjetnejši naravní rezervoarji tega virusa, preko cibetovk pa naj bi se virus prenesel z živali na človeka (16).

Od odkritja virusa SARS so leta 2004 pri 7 mesecev stari deklici odkrili še en nov humani koronavirus, NL63. Kmalu zatem so poročali še o odkritju virusov NL in New Haven, ki sta bila zelo podobna NL63 (15). Kasneje se je izkazalo, da gre dejansko za isti virus, torej najprej opisan NL63. Leta 2005 je bil v Hong Kongu odkrit še zadnji, do zdaj znan humani koronavirus, poimenovan HKU1 (17).

1.3 TAKSONOMIJA

Rod *Coronavirus* spada v družino *Coronaviridae*, ki skupaj z družinama *Arteriviridae* in *Roniviridae* tvori red *Nidovirales* (12). Ime so leta 1968 dobili zaradi ktoni podobne morfologije, ki je vidna pod elektronskim mikroskopom (slika 2).

Glede na antigenske in genetske kriterije delimo koronaviruse v tri glavne skupine: skupino 1, skupino 2 in skupino 3 (13, 18). Do danes je bilo odkritih 5 humanih koronavirusov, in sicer: HCoV-229E (skupina 1), HCoV-OC43 (skupina 2), HCoV-NL63 (skupina 1), HCoV-HKU1 (skupina 2) in SARS-CoV, ki pa ga zaenkrat še ne uvrščamo v nobeno od naštetih skupin (18). Poleg humanih je v skupini 1 in v skupini 2 še veliko drugih koronavirusov, ki okužijo govedo, prašiče, mačke, pse, miši in druge živali. V skupino 3 spadajo koronavirusi, ki jih najdemo izključno pri pticah (17).



Slika 2: Koronavirus, prikazan z elektronsko mikroskopijo (12)

1.4 BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO KORONAVIRUSI

Koronavirusi povzročajo akutne in kronične bolezni dihal in prebavil ter bolezni centralnega živčnega sistema pri mnogih živalih. Pri človeku povzročata tipa HCoV-229E in HCoV-OC43 okužbe zgornjih dihal in sta vsako zimo odgovorna za približno eno tretjino navadnih prehladov (19). Čeprav so okužbe s temo dvema tipoma relativno blage,

so poročali tudi o bolj resnih okužbah zgornjih in spodnjih dihal, kot sta bronhiolitis in pljučnica, še posebej pri dojenčkih, starostnikih in imunsko oslabljenih bolnikih (20).

Okužbe s tipoma HCoV-HKU1 in HCoV-NL63 načeloma niso nevarne. Pogosto gre za navaden prehlad, ki pa pri majhnih otrocih, starostnikih in imunsko oslabljenih bolnikih lahko preide v resnejše bolezni, na primer pljučnico (17).

Prvi primer hude bolezni, povzročene s koronavirusom, pri človeku je bil SARS-CoV, ki povzroča sindrom akutnega oteženega dihanja (12). Koronavirus NL63 povezujejo z nastankom krupa in kawasakijevega sindroma (21, 22, 23).

1.4.1 Sindrom akutnega oteženega dihanja

SARS je pomembna nova nalezljiva bolezen 21. stoletja. Tri značilnosti jo ločujejo od doslej znanih atipičnih pljučnic. Prvič: SARS povzroča nov virus (SARS-CoV), proti kateremu je človeštvo brez imunosti in se zato lahko vsak okuži. Drugič: SARS-CoV ne povzroča blage bolezni, temveč hudo pljučnico, ki v 10–20 % zahteva zdravljenje na intenzivnem oddelku, mehansko predihavanje in se v okoli 15 % konča s smrtjo. Tretjič: SARS je zelo kužna bolezen, ki se z mednarodnim letalskim prometom lahko hitro razširi po svetu in v bolnišnicah lahko okuži visok delež zdravstvenih delavcev (24).

Poslovnež iz province Guandong na jugu Kitajske je bil novembra 2002 verjetno prva žrtev bolezni SARS. Vendar niti ta niti še številne zgodnje žrtve bolezni niso bile deležne mednarodne pozornosti, dokler februarja 2003 ni umrl zdravnik iz province Guandong, ki je zdravil obolele z atipično pljučnico. Okužil je 18 ljudi, od tega 12 gostov hotela M, ki so nato bolezen prenesli v Vietnam, Singapur, Kanado, Irsko in ZDA. Vietnam je bil prva država, v kateri so 28. aprila 2003 uspeli ustaviti širjenje bolezni (24, 25).

V Hongkongu so 17. aprila 2003 prvič ugotovili vzročno povezano med koronavirusom in boleznijo SARS. Kasneje so potrdili najdbo novega koronavirusa kot povzročitelja te bolezni in ga poimenovali SARS-CoV. Za dokazovanje povzročitelja so uporabili klasične in nove metode prepoznavanja: inokulacijo virusa na celične kulture in opazovanje

citopatskih sprememb, proučevanje morfoloških značilnosti z elektronsko mikroskopijo, dokaz prisotnosti specifičnih protiteles ter značilnih odsekov genoma z RT-PCR (24).

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije so se do sredine julija 2003 bolniki z verjetnim SARS-om pojavili v 29 državah; zbolelo je 8.437 ljudi, 813 jih je umrlo (9,6 % smrtnost). Zadnji primer so registrirali 9. junija 2003 v Kanadi (26).

SARS se prenaša predvsem kapljično, do oddaljenosti približno enega metra, in s tesnim stikom z okuženim (24). Najbolj ogroženi so družinski člani in zdravstveni delavci (25).

Med molekularne teste za ugotavljanje prisotnosti genoma SARS-CoV spada metoda RT-PCR. Pozitiven rezultat PCR kaže na prisotnost virusne RNA v vzorcu, toda to še ne pomeni prisotnosti infektivnega virusa. Slednjo lahko določimo z inokulacijo v primerno celično kulturo (Vero celice). Okužbo pri človeku pa lahko potrdimo s serološkimi testi, indirektno fluorescenčno metodo in encimsko imunskimi testi (ELISA), kjer ugotavljamo prisotnost protiteles (25).

1.4.2 Krup

Krup ali laringotraheobronhitis je otroška bolezen, ki ponavadi nastane zaradi virusne okužbe. Običajno se konča sama od sebe in ni nevarna, včasih pa lahko povzroči življenje ogrožajočo zaporo v zgornjih dihalih (27). Eden od vzrokov za to bolezen je tudi koronavirus NL63 (21).

1.4.3 Kawasakieva bolezen

Kawasakieva bolezen je sistemski vaskulitis, ki se pojavi v otroštvu, njegova posledica je lahko anevrizma koronarnih arterij. V razvitem svetu je ta bolezen najpogostejši vzrok za pridobljeno bolezen srca pri otrocih (22).

Narejene so bile različne raziskave, ki so nakazovale povezanost koronavirusa NL63 s kawasakijevo boleznijo, druga poročila pa so te trditve ovrgla (12, 22, 28).

1.5 ZGRADBA VIRIONA

Koronavirusi so virusi z ovojnico, ki imajo premer od 80 do 120 nm. Genom predstavlja zelo velika (približno 30 kb) enovijačna pozitivno polarna RNA, ki skupaj s strukturno nukleokapsidno beljakovino N tvori helikalno simetrijo kapside (12).

1.5.1 Strukturne beljakovine

Ena tretjina 3' konca koronavirusnega genoma predstavlja zaporedje, ki kodira različne strukturne beljakovine, kot so S, E, M, HE in N beljakovina (slika 3). Vse, razen zadnje, so membranske beljakovine (29).

1.5.1.1 S beljakovina

S beljakovina ali "spike" beljakovina je glikoprotein, ki se sintetizira v endoplazmatskem retikulumu in tvori bodičaste peplomere na površini viriona, kar mu daje značilno morfologijo (12, 30). Pod elektronskim mikroskopom ga vidimo kot jasne, 20 nm dolge podaljške na virusni membrani (30).

Beljakovina S je odgovorna za vstop v gostiteljsko celico in za širjenje iz ene celice v drugo. Poveže se s specifičnimi receptorji na gostiteljski celici, to sproži konformacijske spremembe beljakovine, kar pomaga pri fuziji virusne in celične membrane (30).

Pri določenih koronavirusih, predvsem pri skupini 2 in 3, se S beljakovina s proteazo razcepi na dve podenoti, S1 in S2 (12). Del, ki je odgovoren za vezavo z receptorjem, se nahaja na podenoti S1, del, odgovoren za fuzijo membran, pa na S2 (30).

1.5.1.2 M beljakovina

M beljakovina je transmembranska beljakovina, ki trikrat prečka virusno ovojnico in ima kratek N-končni zunanji del in citoplazemski rep. Poleg vloge pri sestavljanju virusa naj bi imela vlogo tudi pri različnih interakcijah z gostiteljsko celico (12).

1.5.1.3 E beljakovina

E beljakovina je integralna membranska beljakovina, ki ima skupaj z M beljakovino pomembno vlogo pri sestavljanju virusa. Ne dolgo nazaj so ugotovili, da naj bi imela E

beljakovina pri virusu SARS kationsko selektiven kanal, katerega vloge še ne poznajo, vendar sklepajo, da bi lahko pripomogel k virusni morfogenezi in sestavljanju (12).

1.5.1.4 HE beljakovina

Nekateri koronavirusi iz skupine 2 imajo še eno membransko beljakovino, hemaglutinin esterazo (HE). Ta beljakovina tako kot S tvori peplomere, ki pa so manjše. Zgrajena je iz 42 kDa velikega apoproteina in 23 kDa velikega glikoziliranega dela. Oba dela se preko disulfidnega mosta povežeta v homodimer.

HE beljakovina v preteklosti ni bila deležna velike pozornosti, verjetno zato, ker ni pomembna pri virusni replikaciji, tako njena vloga še ni povsem jasna (12).

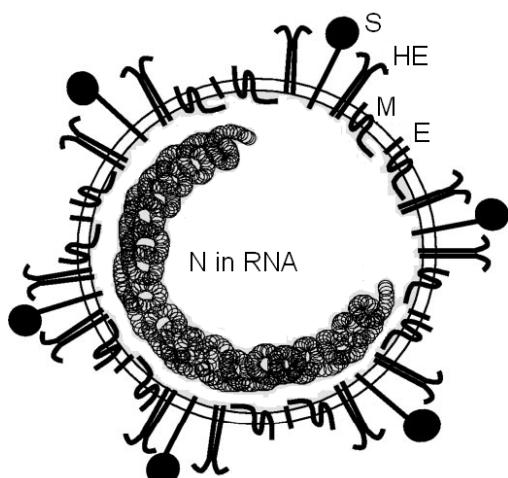
1.5.1.5 Nukleokapsidna beljakovina

Med strukturne beljakovine spada še N beljakovina, ki sodeluje tudi pri transkripciji in pri patogenezi (12).

1.5.2 Replikacijske beljakovine

Dve tretjini 5' konca koronavirusnega genoma zavzema zaporedje, ki kodira dva poliproteina (1a in 1b), iz katerih nastanejo vse beljakovine, ki so potrebne za RNA replikacijo (29).

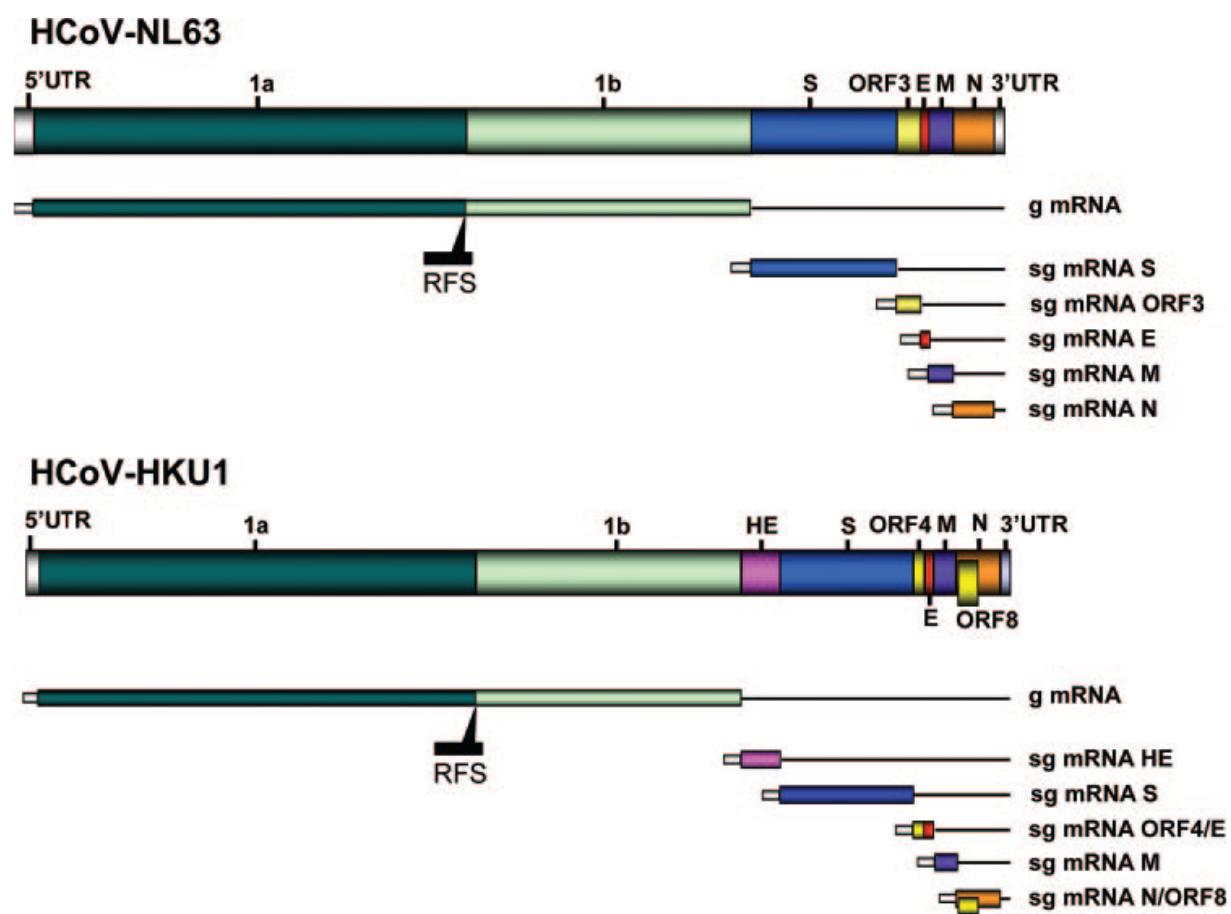
Tudi replikacijske beljakovine bi lahko imele vlogo pri virusnemu tropizmu in patogenezi z določanjem hitrosti virusne replikacije, verjetno preko interakcij z netranslacijskimi zaporedji (UTR), s celično specifičnimi faktorji ali pa z elementi imunskega odziva (12).



Slika 3: Zgradba viriona (prirejeno po 12)

1.5.3 Genom

Pozitivno polarni RNA genom koronavirusov je največji virusni genom med RNA virusi, saj obsega od 27 do 33 kb. Enovijačna RNA ima na 5' koncu metilgvanozinsko kapo, na 3' koncu pa poli-A rep. Genom vseh koronavirusov ima podobno strukturo. Približno 20 do 22 kb (približno dve tretjini) na 5' koncu sestavlja dva odprtih bralnih okvirjev ORF1a in ORF1b, ki kodirata zapis za beljakovine, potrebne pri virusni replikaciji (nestruktурne beljakovine). Ostalo tretjino na 3' koncu pa sestavljajo odprti bralni okvirji, ki kodirajo zapis za strukturne beljakovine: HE (le nekateri predstavniki iz skupine 2), S, E, M in N. Na obeh koncih genomske RNA se nahaja netranslacijsko zaporedje (UTR), na 5' koncu vsakega odprtega bralnega okvirja pa transkripcijsko regulatorno zaporedje (TRS), ki je ključno pri nastajanju subgenomskih mRNA. Pomembna je struktura med ORF1a in ORF1b (RFS), ki sodeluje pri sintezi replikacijskih beljakovin (slika 4) (12, 17, 31).



Slika 4: Struktura genoma HCoV-NL63 in HCoV-HKU1 (17)

1.6 VIRUSNI ŽIVLJENJSKI CIKEL

Koronavirus se pripne na specifične celične receptorje preko beljakovine S, kar sproži konformacijske spremembe beljakovine in fuzijo celične in virusne membrane. Na ta način se nukleokapsida sprosti v notranjost celice (12).

Receptorji, na katere se vežejo koronavirusi, so različni. Sprva so mislili, da vsi predstavniki koronavirusov v skupini 1 uporabljajo za svoj receptor molekulo CD13, znano tudi kot aminopeptidaza N, vendar so kasneje ugotovili, da to molekulo uporablja le tip 229E. Receptor za koronavirus NL63 je molekula angiotenzin konvertaza 2, ki prej ni bila znana kot receptor za koronaviruse. Tipa OC43 in HKU1 pa uporablja N-acetil nevraminsko kislino (12, 17).

Aminopeptidaza N je metaloproteaza, velika 150 kDa (32). Je transmembranska beljakovina s kratkim citoplasmatskim NH₂-končnim segmentom in dolgim ekstracelularnim COOH-končnim segmentom, ki se nahaja na celični površini v obliki homodimera (33). Prisotna je v številnih celicah in tkivih, na primer v ledvicah, pljučih, pa tudi na granulocitih in monocitih (32).

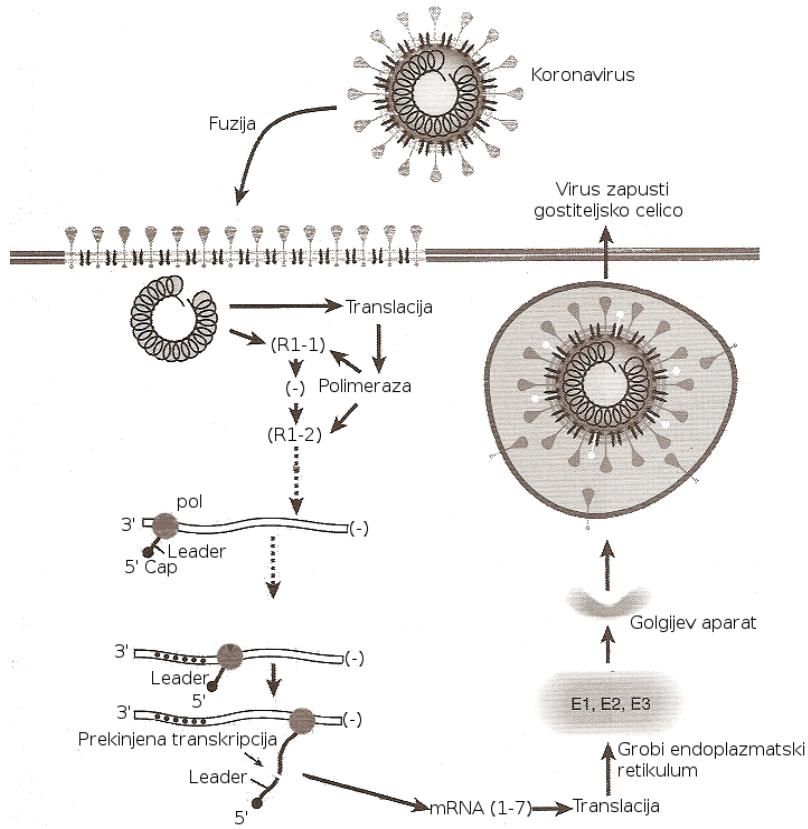
Angiotenzin konvertaza 2 (ACE2) je površinska molekula, ki se nahaja na arterijskih in venskih endotelnih celicah, arterijskih gladkih mišičnih celicah, na epiteliju tankega črevesja in tudi na ciliarnem epiteliju traheobronhialne poti. ACE2 je homolog beljakovine ACE, oba pa sta ključna encima v renin-angiotenzin sistemu (17).

Sialna (N-acetil nevraminska) kislina se nahaja v različnih vrstah celic in je sestavni del celičnih receptorjev (34).

Replikacija koronavirusov poteka izključno v citoplazmi (11). Virusi s pozitivno polarno RNA nimajo virusne polimeraze, zato se njihova ekspresija gena začne s translacijo, ki poteka s pomočjo gostiteljske celice (35). Replikacijski in transkripcijski encimi so kodirani na odprtem bralnem okvirju 1a in 1b. Nastaneta dva poliproteina, pp1a in pp1ab (sinteza slednjega vključuje ribosomski premik bralnega okvirja), ki se nato s posebnimi encimi, kodiranimi na virusnemu genomu, cepita v 16 nestrukturnih beljakovin (nsp). Vsaj

8 beljakovin naj bi imelo encimske aktivnosti, od katerih so nekatere skupne vsem RNA virusom (npr. od RNA odvisna RNA polimeraza, proteinaze, 5'→3' helikaza) (36). Vseh 16 beljakovin skupaj s številnimi drugimi beljakovinami tvori replikacijski kompleks, katerega naloga sta genomska replikacija in transkripcija (37). Replikacija genoma vključuje nastanek celotne negativne verige RNA, ki služi kot matrica za sintezo genomske RNA, transkripcija pa nastanek subgenomskih mRNA, tudi z negativno polarnimi intermediati. Transkripcija pri koronavirusih poteka prekinjeno, kar pomeni, da se sinteza mRNA verige pri določenem zaporedju ustavi in nadaljuje na skrajnjem 5' koncu genomske RNA, kjer je transkripcijsko regulatorno zaporedje. Tako imajo vse mRNA na svojem 5' koncu enako vodilno zaporedje (leader) (36), mRNA se prevede v beljakovine, in sicer le prvi ORF na 5' koncu (17, 35).

Zreli in sestavljeni virioni pridobijo ovojnico z brstenjem skozi intracitoplazemske vezikle, ki nato potujejo proti celični površini, kjer virus zapusti gostiteljsko celico, ta pa čez čas poči (slika 5) (11).



Slika 5: Življenjski cikel koronavirusa (povzeto po 11)

1.7 REKOMBINACIJA KORONAVIRUSOV

Včasih se med okužbo dva genetsko različna virusa fizično zapleteta med seboj in zaradi bližine lahko nastane rekombinantni virusni genom (11). Pojavlja se virus s spremenjenim genotipom in fenotipom (34). Proces rekombinacije ponavadi nastane med fazo replikacije genoma (11).

Najpogostejše genetske rekombinacije so intramolekularna rekombinacija, prerazporeditev genov in reaktivacija. Pri intramolekularni rekombinaciji se med sintezo genoma izmenjujejo krajsi in daljši odseki nukleinskih kislin dveh različnih, vendar sorodnih virusov. Prerazporeditev genov se pojavlja pri virusih s segmentiranim genomom. Po okužbi celice z dvema sorodnima virusoma se lahko naključno izmenjajo celotni segmenti (geni). Posebna oblika rekombinacije je multipla reaktivacija, kjer sodeluje več nekužnih istovrstnih virusov, ki imajo letalne mutacije različnih genov. Med razmnoževanjem se lahko geni izmenjajo in nastane kužni (rekombinantni) virus z normalnim genomom (34).

Rekombinacija je pomemben mehanizem za razvoj novih virusnih genotipov (38). Lahko je tudi vzrok za nastanek visoko patogenih rekombinantnih virusov (29). Zaradi posebnega mehanizma virusne replikacije imajo koronavirusi visoko frekvenco rekombinacije, kar jim omogoča prilagoditev novemu gostitelju in ekološkim nišam (38). Poteka intramolekularna rekombinacija po mehanizmu 'copy-choice', kjer se od RNA odvisna RNA polimeraza, skupaj z nastajajočo verigo RNA, loči od prvotne matrice in se priključi drugi matrici na enakem mestu ter tam nadaljuje sintezo RNA verige (29).

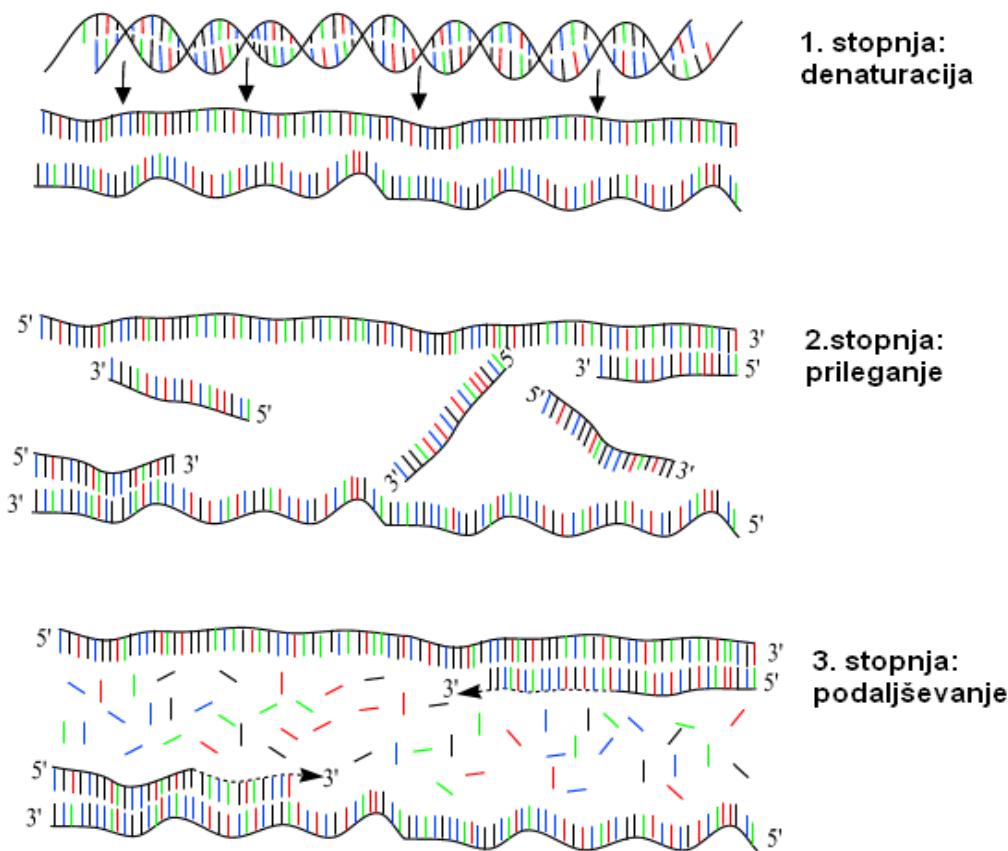
Predvidevajo, da sta se pred približno 900 leti virusa HCoV-229E in HCoV-NL63 začela razvijati iz skupnega prednika in se nato ločila v dva različna tipa. Zato je virusu HCoV-NL63 najbolj podoben HCoV-229E. Za HCoV-OC43 ocenjujejo, da se je pojavil nekje na koncu 19. ali na začetku 20. stoletja, torej obstaja okoli 100 let. SARS-CoV se je pojavil leta 2002, za HCoV-HKU1 pa tega podatka še ni (29). V raziskavi, ki je bila objavljena leta 2006, so 22 virusom tipa HKU1 določili celotno zaporedje genoma in ugotovili prisotnost tretjega genotipa (genotipa C), ki naj bi nastal z rekombinacijo genotipov A in B. To je bil prvi dokaz naravne rekombinacije, ki je bil dokumentiran za koronaviruse,

povezane z okužbo človeka (38). Heterogenost tega tipa kaže, da je virus verjetno že nekaj časa med nami (29).

1.8 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO – TEORETIČNE OSNOVE

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je najpogosteša metoda za pomnoževanje nukleinske kisline pri diagnostiki infekcijskih bolezni. PCR lahko pomnožuje DNA, pri predhodni inkubaciji z obratno transkriptazo (RT) pa tudi RNA. RT-PCR je najbolj občutljiva metoda za detekcijo in kvantifikacijo mRNA. Potek PCR lahko v osnovi razdelimo na tri stopnje, ki se 30- do 40-krat ponovijo (slika 6):

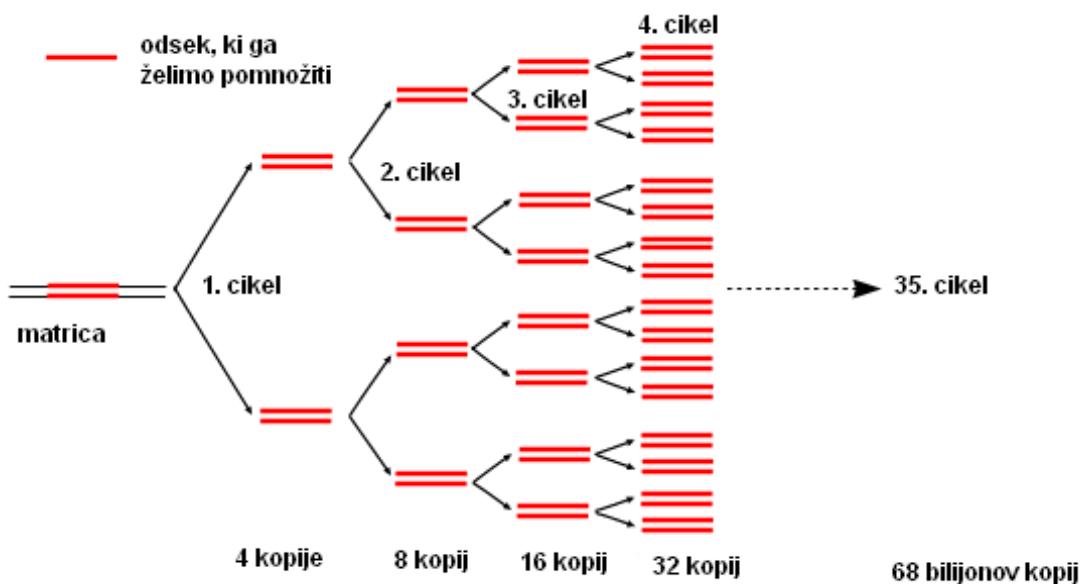
- dvovijačna DNA se denaturira in loči pri temperaturi nad 90 °C
- prileganje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50–60 °C
- podaljševanje verige pri temperaturi 70–78 °C (39)



Slika 6: Shematski prikaz principa PCR (prirejeno po 40)

Podaljševanje verige poteka s pomočjo termostabilne polimeraze DNA. Najpogosteje se uporablja polimeraza Taq, ki izvira iz termostabilne bakterije *Thermus aquaticus*. Polimeraza Taq najbolje deluje pri temperaturi okoli 72 °C, preživi pa tudi večkratno segrevanje do 90 °C. Kot druge polimeraze DNA tudi Taq za svoje delovanje potrebuje začetne oligonukleotide s prosto 3' hidroksilno skupino (41).

Ker se pomnožujeta obe verigi, število kopij narašča eksponentno (slika 7).



Slika 7: Eksponentno naraščanje odsekov, ki jih pomnožujemo (prirejeno po 40)

1.8.1 PCR v realnem času

PCR v realnem času je metoda, pri kateri naenkrat potekata pomnoževanje nukleinske kisline in detekcija pridelkov. S tem je tveganje glede izpusta pomnoženih nukleinskih kislin v okolje in kontaminacije poznejših analiz zanemarljivo v primerjavi s tradicionalnimi PCR metodami. Pomnoževanje nukleinske kisline in detekcija pridelkov sta končana v približno eni uri, kar je nekajkrat hitreje kot pri tradicionalnih metodah PCR z elektroforezo in klasični detekciji (42). Večja hitrost te metode je posledica posebej prilagojenih reagentov, neizvajanja detekcijskih metod po PCR reakciji in uporabe sond, označenih s fluorofori (43).

Za identifikacijo organizma ali za določanje njegove količine mora biti tarčni odsek na nukleinski kislini ohranjen. Če zaporedje, ki ga nameravamo množiti, kaže na pomembne polimorfizme, je potrebno izbrati bolj ohranjen tarčni odsek nukleinske kisline (42).

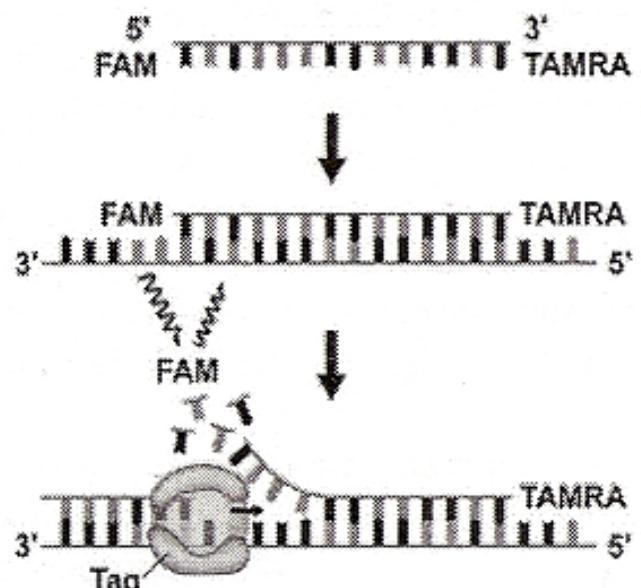
Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov mora biti specifično, da lahko zaznamo določen organizem (ali skupino) oziroma določimo njegovo količino (42).

Detekcija PCR pridelkov lahko poteka s pomočjo sond (specifična detekcija) ali brez njih (nespecifična detekcija).

Pri nespecifični detekciji se največkrat uporablja fluorescentno barvilo SYBR Green I. Nevezano barvilo oddaja le malo fluorescence. Med PCR reakcijo pa se nespecifično vgradi v katero koli dvovijačno DNA in povečana količina vezanega barvila poveča fluorescenco (44).

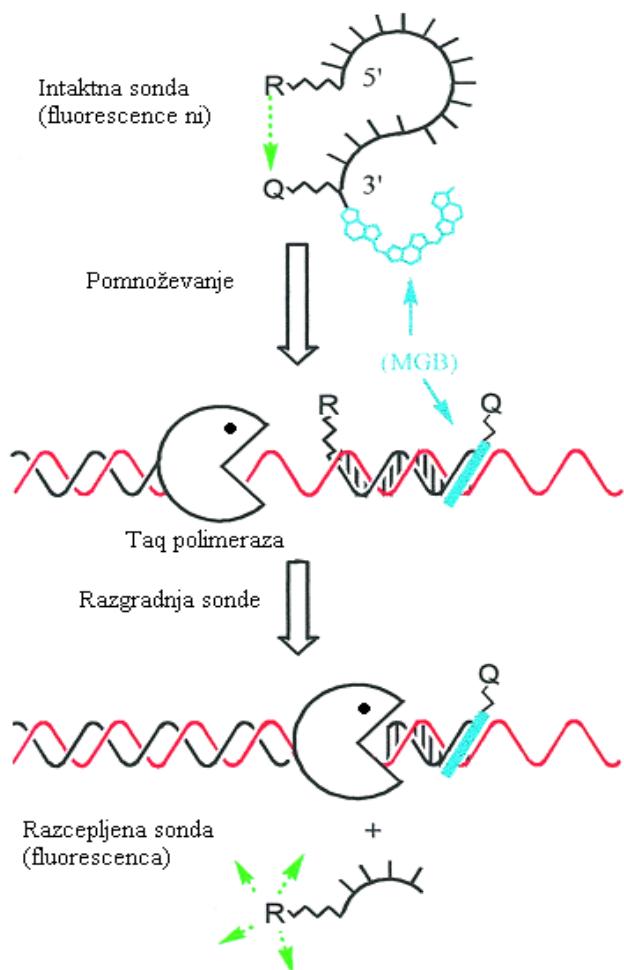
Specifična detekcija temelji na prenosu fluorescenčne resonančne energije (FRET) med fluoroforom in dušilcem. V tem primeru uporabimo sonde, ki so označene s fluorofori, najpogosteje sonde TaqMan (imenujemo jih tudi 5' nukleazne sonde) (42).

Sonda TaqMan je kratek oligonukleotid, ki ima na 5' koncu vezan reporterski fluorofor (6-karboksi-fluorescein, FAM), na 3' koncu pa dušilec (6-karboksi-tetrametil-rodamin, TAMRA). Da se pojavi signal, se mora sonda najprej vezati na komplementarno verigo DNA pri 60 °C, nato pa mora, pri enaki temperaturi, polimeraza Taq s svojo 5' nukleazno aktivnostjo cepiti 5' konec sonde TaqMan in s tem ločiti fluorofor od dušilca. Na ta način se razdalja med njima veča, posledično pa se FRET zniža, kar povzroči signal (slika 8) (42).



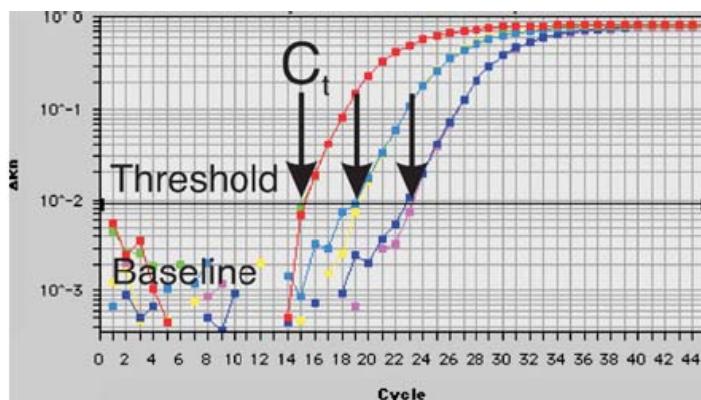
Slika 8: Mehanizem delovanja TaqMan sonde (prirejeno po 42)

Različica sonde TaqMan je sonda MGB, ki ima na 5' koncu vezan fluorofor, na 3' koncu pa dušilec in del, ki se imenuje MGB (minor groove binder). Ta molekula se skrije v mali jarek dvovijačne DNA in tvori zelo stabilen dupleks s komplementarnim odsekom enovijačne DNA (39). Signal se pojavi enako kot pri sondi TaqMan, zaradi 5' nukleazne aktivnosti polimeraze Taq (slika 9). Fluorescenčno ozadje pri sondah MGB ima nižjo stopnjo fluorescence kot pri sondah brez molekule MGB. To pa omogoča uporabo krajših sond, zato pa se zmanjša tudi razdalja med fluoroforom in dušilcem (45).



Slika 9: Prikaz delovanja MGB sonde (prijejeno po 46)

Količina odcepljenega (prostega) fluorofora se veča po vsakem PCR temperaturnem ciklu in je odvisna od količine vezane in posledično razgrajene sonde. Signal lahko zato merimo kadar koli med pomnoževanjem, običajno po končanem koraku podaljševanja verige (42). Meritve se prikažejo s krivuljami (slika 10).

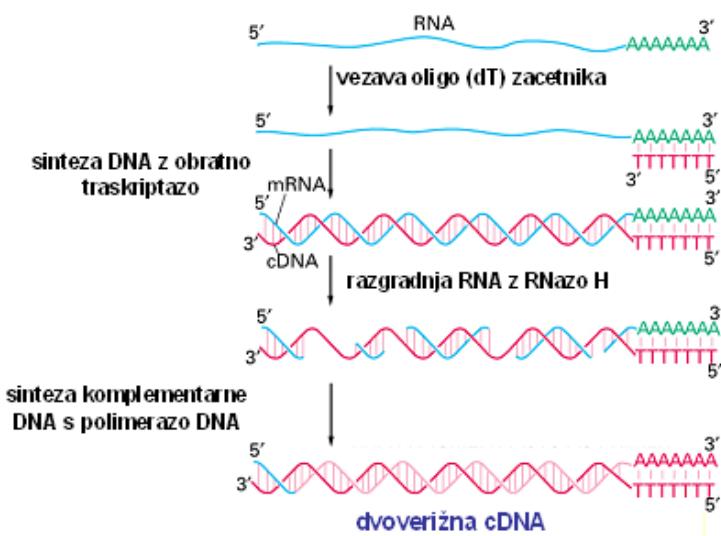


Slika 10: Pomnoževalna krivulja za tri vzorce (44)

C_t vrednost, ki je označena s puščicami, predstavlja cikel, ko je instrument prvič zanesljivo zaznal fluorescenco, torej kjer krivulja seka linijo praga (threshold), ki jo lahko določi instrument sam ali oseba, ki ga upravlja. Fluorescenčni signal, ki je v prvih nekaj ciklih pod zaznavo instrumenta, se imenuje ozadje.

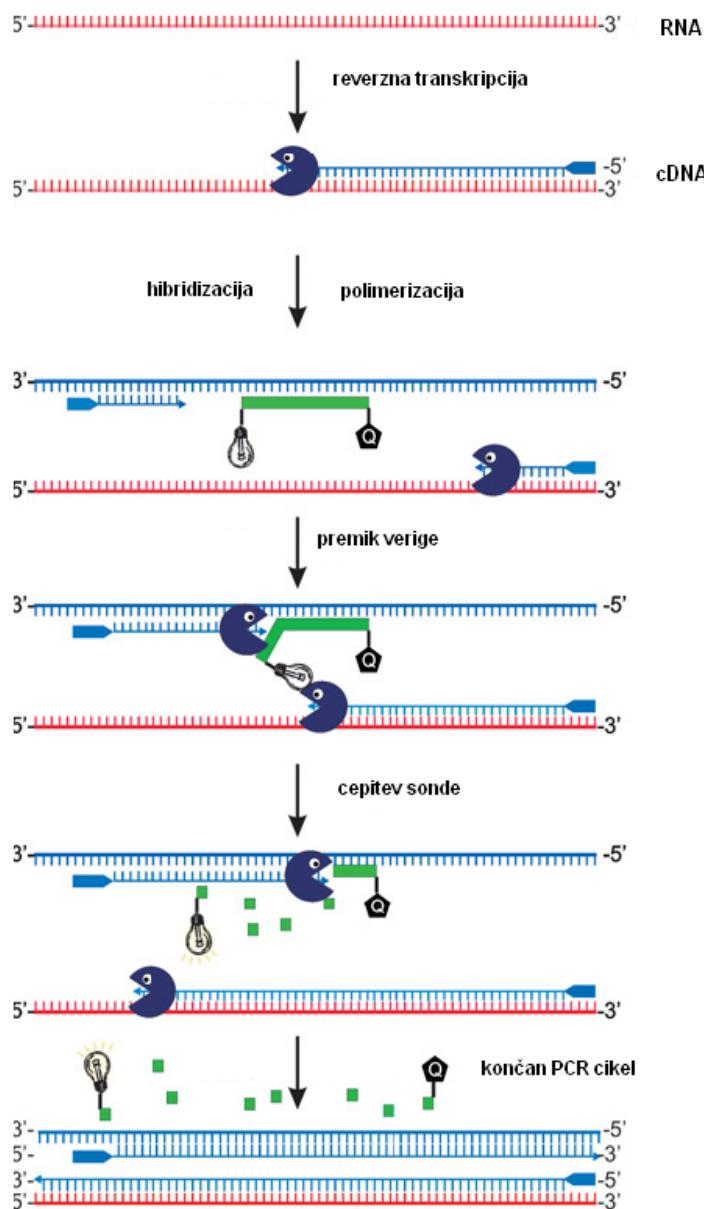
Ker imajo koronavirusi genom iz RNA, smo uporabili različico RT-PCR, kjer obratna transkriptaza (RT) najprej pretvori RNA v komplementarno DNA (cDNA).

Proces se začne s prileganjem oligonukleotidnega začetnika, ki je komplementaren poli-A repu na 3' koncu molekule RNA. Obratna transkriptaza je encim, ki prepisuje molekulo RNA v DNA (cDNA). Nastane molekula, ki je zgrajena iz ene verige RNA (matrična veriga) in ene verige DNA. Encim RNaza H razgradi verigo RNA, DNA polimeraza pa prepiše enovijačno cDNA v dvovijačno cDNA (slika 11) (47).



Slika 11: Nastanek cDNA z obratno transkriptazo (prirejeno po 47)

Po denaturaciji se na tarčne odseke verige vežejo začetni oligonukleotidi in sonde z reporterskim fluoroforom in dušilcem. Sledi polimerizacija, pri kateri polimeraza Taq razcepi pripeto sondu in s tem fizično loči reporterski fluorofor in dušilec, posledica česar je fluorescensa. Povečan signal fluorescence je v sorazmerju s številom molekul, ki nastanejo pri določenem ciklu. Kopiranje PCR produktov se meri s povečanjem fluorescence reporterskega fluorofora (slika 12) (44).



Slika 12: Princip 5' nukleaznega testa (prirejeno po 44)

1.9 DOLOČANJE KORONAVIRUSOV

Koronaviruse je izredno težko gojiti na celičnih kulturah, zato je točna in občutljiva diagnostika s to metodo nemogoča (20). HCoV-NL63 je mogoče gojiti na opičjih epitelnih celičnih kulturah (LLC-MK2, Vero E6, Vero B4). Zanimivo pa je, da to pri njegovemu najbližjem sorodniku HCoV-229E ni mogoče.

Serološke metode, ki večinoma temeljijo na encimsko imunskih testih, ponavadi zahtevajo precej časa in imajo zato majhen klinični pomen. Da bi povečali občutljivost in dobili rezultate v relativno kratkem času, so razvili bolj občutljive molekularne metode, kot so PCR z obratno transkriptazo (RT-PCR), gnezdrov PCR in PCR v realnem času, ki smo jo tudi uporabili v diplomski nalogi. Velika prednost te metode je, da pomnoževanje in analiza potekata v zaprtem sistemu. Tako do rezultatov pridemo hitreje kot pri drugih PCR metodah, ki zahtevajo dodatno ugotavljanje pridelkov. Zaradi zaprtega sistema je tudi tveganje za kontaminacijo precej manjše (20).

2. NAMEN DELA

Nedavno nazaj je bilo ugotovljeno, da so koronavirusi navzoči v pomembnem deležu akutnih okužb dihal, ki pri določenih populacijah lahko povzročajo resnejša stanja. V Sloveniji do sedaj ni bila izvedena nobena raziskava, ki bi dokazala prisotnost koronavirusov pri bolnikih z okužbami dihal. Zato smo želeli z metodo RT-PCR prvič ugotoviti, ali se ti virusi pojavljajo tudi pri nas.

Če bi uspeli dokazati okužbo s koronavirusi, bo izbrana metoda omogočala tudi tipizacijo virusa. Za morebitne dokazane primere bomo preverili rezultate rutinskega testiranja virusnih povzročiteljev dihal z direktno imunofluorescenco, njihove demografske značilnosti in časovno pojavljanje.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V treh mesecih, od prvega januarja do konca marca 2007, je bilo v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij v Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani poslanih 1.288 vzorcev v redno diagnostiko za virusne okužbe.

Vzorci so bili kužnine dihal: brisi žrela, ki jih je bilo največ, brisi nazofarinks, aspirati tracheje, brisi nosu, bris tonzil in aspirat iz kanile. Za vse vzorce je bil narejen test direktne imunofluorescence (DIF) na prisotnost virusnih antigenov adenovirusa, respiratornega sincicijskega virusa, virusov influenc A in B, virusov parainfluenca 1, 2 in 3. Rezultati DIF so shranjeni v laboratorijskem informacijskem sistemu. Vsi vzorci so bili do našega testiranja shranjeni pri -20 °C.

Izmed 1.288 poslanih vzorcev smo jih naključno izbrali 160, med katerimi je bilo 85 moških (53,1 %) in 75 žensk (46,9 %). 75 preiskovancev (46,9 %) je pripadlo starostni skupini do 1. leta, 41 (25,6 %) starostni skupini od 1. do 2. leta, 14 (8,8 %) starostni skupini od 2. do 3. leta in 30 (18,7 %) preiskovancev pa je bilo starih 3 leta ali več (priloga A). Pri izbiri vzorcev podatkov testiranja DIF nismo upoštevali, saj smo jih potrebovali šele kasneje – za ugotavljanje morebitnih koinfekcij.

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE

- komora za varno delo
- mešalo vorteks
- električno mešalo
- centrifuga 5412R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- epruvetke
- stojalo za epruvetke
- pipete z območji pipetiranja 2–20 µl, 10–100 µl in 50–200 µl (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- nastavki za pipete
- zaščitne rokavice

- raztopina RNase free (Mercury reagents, CLP, Sollentuna, Švedska)
- natrijev hipoklorit
- 8 epruvetk za izvedbo reakcije PCR
- aparatura Step One za izvajanje Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA)
- MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Švica)

3.3 REAGENTI ZA IZOLACIJO RNA

Uporabili smo MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Švica), ki vsebuje:

- 32 kartuš z reagenti
- 32 setov nastavkov za pipetiranje (v enem sta dva velika in en manjši nastavek)
- DNAAza
- litični pufer
- 2×35 epruvetk (2 ml) za vzorce
- 35 elucijskih epruvetk (2 ml)
- 35 pokrovčkov za elucijske epruvetke

Vse reagente smo do uporabe shranjevali pri 4°C , pred uporabo pa so bili ogreti na sobno temperaturo.

3.4 REAGENTI ZA REAKCIJO RT-PCR

- oligonukleotidni začetniki
- sonde
- ddH₂O
- SuperScript[™] III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), ki vsebuje:
 - zmes obratne transkriptaze in Taq DNA polimeraze
 - dve reakcijski zmesi (pufer z 0,4 mM vsakega dNTP in 6 mM MgSO₄)
 - 50 mM magnezijevega sulfata (MgSO₄)

- barvilo ROX

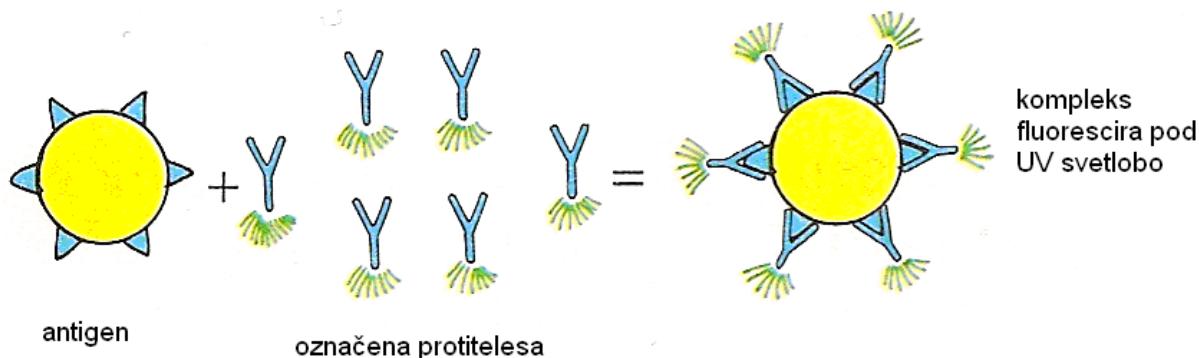
Oligonukleotidne začetnike, sonde, ddH₂O in odprti magnezijev sulfat smo shranjevali pri 4 °C, ostalo pa pri -20 °C.

3.5 DIREKTNA IMUNOFLUORESCENCA

To metodo bomo samo omenili, saj smo uporabili le njene rezultate, da smo ugotavljali koinfekcije.

Imunofluorescentne tehnike uporabljajo fluorescentna protitelesa (protitelesa, ki so označena s fluorokromom) za odkrivanje kakega antiga ali protitelesa. Od vseh fluorokromov se največ uporablja fluoresceinov izotiocianat (zelena fluorescencija) in rodaminov izotiocianat (rdeča fluorescencija). Protitelesa, ki so zaznamovana z eno ali več molekulami fluorescentnega barvila, intenzivno fluorescirajo, vendar še vedno obdržijo svojo specifičnost.

Pri direktni metodi se na antigen direktno veže s fluorokromom označeno protitelo (48). Kompleks antigen-protitelo vidimo kot svetlečo obliko v fluorescenčnem mikroskopu (slika 13) (49).

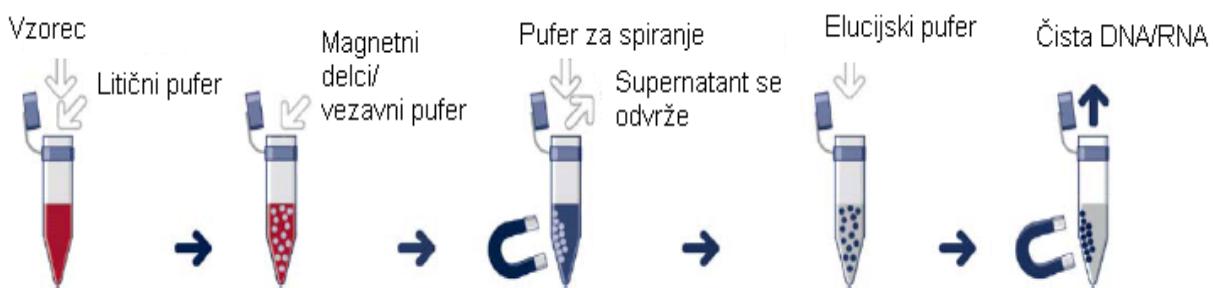


Slika 13: Shematski prikaz direktno imunofluorescence (49)

3.6 IZOLACIJA RNA

Virusno RNA smo izolirali na biorobotu MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Švica) in uporabili MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Švica), pri katerem se

uporablja tehnologija magnetnih delcev. Ta tehnologija ima precej prednosti, saj se izolacija izvaja neposredno iz še neobdelanega vzorca, izognemo pa se tudi centrifugiraju in tveganju navzkrižne kontaminacije (50). Delci imajo magnetno jedro in zunanj plast iz stekla, na katero se veže nukleinska kislina (51). Ko s trajnim magnetom ustvarimo magnetno polje, se delci premaknejo proti magnetu. To je hiter in učinkovit način, da ločimo delce, potem ko se je nanje vezala nukleinska kislina oz. po eluciji (50). Magnet postavimo ob strani epruvetke, tako da se delci zberejo ob steni, ostanek vzorca pa odstranimo (slika 14). Pri izolaciji RNA je potrebno dodati še DNAAzo, da razgradi genomsko DNA.



Slika 14: Shematski prikaz izolacije nukleinske kisline s tehnologijo magnetnih delcev (prirejeno po 50)

1. Dodatek litičnega pufra zunaj instrumenta MagNA Pure Compact v vzoru tkiva, celičnih kultur ali belih krvnih celic.
2. Ob dodatu magnetnih steklenih delcev se nukleinska kislina veže na površino teh delcev. Pri izolaciji RNA je potreben dodaten korak, in sicer razgradnja genomske DNA z inkubacijo z DNAAzo.
3. Odstranitev nevezanih snovi s spiranjem.
4. Dodatek elucijskega pufra.
5. Izolat celotne DNA oz. RNA.

Pred začetkom dela smo vzorce, ki so bili shranjeni pri -20 °C, odmrznili in jih dobro premešali. V 1,5 ml epruvetke smo pipetirali po 200 µl posameznega vzorca. Ker smo izolirali RNA, smo za razgradnjo genomske DNA uporabili 20 µl DNAAze. V aparat smo vstavili vse potrebne pripomočke, vključno s stojalom z vzorci. Pomembno je, da kartuše z reagenti pred vstavljanjem v aparat dobro pretresemo, saj se tako magnetni delci enakomerno porazdelijo. Izbrali smo protokol "RNA blood", 200 µl vzorca in 100 µl elucije. RNA smo po eluciji shranili pri -20 °C.

3.7 DOLOČANJE KORONAVIRUSOV Z ENOSTOPENJSKO METODO RT-PCR V REALNEM ČASU

Vse potrebne podatke za izvedbo reakcije PCR smo vzeli iz članka *Clinical Disease in Children Associated with Newly Described Coronavirus Subtypes*, avtorjev Kuypers, J., Martin, E. T., Heuge, L. J., Wright, N., Morrow, R., Englund, J. A. (19). Članek je bil objavljen leta 2007 v reviji Pediatrics.

Reakcijo smo izvedli z aparatom StepOne Real-Time PCR (StepOne Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA) in uporabili SuperScriptTM III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Pomnoževali smo 85–100 bp dolg odsek na polimeraznem genu 1b (19). To je zelo ohranjen del genoma, ki kodira zapis za sintezo od RNA odvisne RNA polimeraze (29).

Za vse vzorce smo najprej izvedli presejalni PCR. Nato smo vsem pozitivnim vzorcem naredili še tipizacijski PCR, pri katerem smo določili tip koronavirusa: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 in HCoV-HKU1. Virus, ki povzroča SARS, nismo ugotavljali.

3.7.1 Kontrole

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili RNA virusnega izolata koronavirusa NL63, ki so nam ga posredovali raziskovalci Univerze Erasmus v Roterdamu, in vzorce, ki smo jih dobili v testiranje iz servisa QCMD za nadzor kakovosti dela v laboratoriju. Vzorci QCMD so vsebovali pozitivne vzorce na koronaviruse OC43, HKU1 in 229E.

Za negativno kontrolo smo uporabljali vodo, primerno za uporabo v molekularni biologiji.

3.7.2 Oligonukleotidni začetniki

Uporabili smo naslednje oligonukleotidne začetnike, ki so bili pripravljeni v koncentraciji 20 µM:

5' proti 3' začetniki:

- F1 5'-TGGTGGCTGGACGATATGT-3'
- F2 5'- TTTATGGTGGTTGGAATAATATGTTG-3'
- F3 5'-TGGCGGGTGGGATAATATGT-3'
- F-OC 5'-CCTTATTAAAGATGTTGACAATCCTGTAC-3'

3' proti 5' začetniki:

- R1 5'-GGCATAGCACGATCACACTTAGG-3'
- R2 5'-GGCAAAGCTCTATCACATTGG-3'
- R3 5'-GAGGGCATAGCTCTATCACACTTAGG-3'
- R-OC 5'-AATACGTAGTAGGTTGGCATAGCAC-3'

3.7.3 Sonde

Sonde TaqMan, s koncentracijo 10 µM, so bile na 5' koncu označene s fluoroforom 6FAM in na 3' koncu z MGB in dušilcem, ki ne fluorescira (Applied Biosystems, Foster city, Kalifornija, ZDA).

- P1 5'-ATAATCCAACCCATRAG-3'
- P2 5'-ATAGTCCCATCCCCATCAA-3'
- P-OC 5'-CACACTTAGGATAGTCCCA-3'

3.7.4 Presejalni PCR

Vse naključno izbrane vzorce smo s presejalno PCR reakcijo testirali na prisotnost koronavirusa. Reakcijska mešanica je vsebovala 6 oligonukleotidnih začetnikov (F1, F2, F3, R1, R2 in R3), od katerih je bil vsak pripravljen v koncentraciji 20 µM in dve sondi (P1 in P2) v koncentraciji 10 µM.

Sestava reakcijske mešanice:

- oligonukleotidni začetniki F1, F2, F3, R1, R2 in R3 v koncentraciji 20 µM
- sondi P1 in P2 v koncentraciji 10 µM
- MgSO₄ v koncentraciji 50mM
- pufer
- zmes obratne transkriptaze in Taq DNA polimeraze
- ROX barvilo

- ddH₂O

K 5 µL vzorca RNA smo dodali 15µL reakcijske mešanice.

3.7.5 Tipizacija

Pri vseh vzorcih, ki so pri presejalnem testiranju pokazali pozitivno reakcijo, smo izvedli še tipizacijo. Priprava reakcijske mešanice se je razlikovala glede na tip virusa, ki smo ga določali. Za vsak pozitiven vzorec smo izvedli štiri različne PCR reakcije z začetnimi oligonukleotidi in sondami, ki so specifični za določen tip virusa. Za določanje tipa 229E smo uporabili kombinacijo oligonukleotidnih začetnikov in sond F3/P2/R3, za določanje tipa NL63 pa F2/P1/R2. Tipa OC43 in HKU1 smo določali skupaj z eno reakcijsko mešanicą v kombinaciji F1/P1/R1. Za vzorce, ki so bili pri tej reakciji pozitivni, pa smo uporabili reakcijsko mešanicę, ki je vsebovala oligonukleotidne začetnike in sonde F-OC, P-OC, R-OC, ki so specifični za tip OC43 (preglednica I).

Preglednica I: Oligonukleotidni začetniki in sonde v tipizacijskih reakcijskih mešanicah PCR za določanje posameznega tipa koronavirusa

Tip koronavirusa	Oligonukleotidni začetniki	Sonda
229E	F3 in R3	P2
NL63	F2 in R2	P1
OC43 in HKU1	F1 in R1	P1
OC43	F-OC in R-OC	P-OC

Oligonukleotidni začetniki so bili pripravljeni v koncentraciji 20 µM, sonde v koncentraciji 10 µM in raztopina MgSO₄ v koncentraciji 50 mM.

Vse štiri reakcijske mešanice PCR za dokazovanje posameznega tipa koronavirusa so vsebovale MgSO₄, zmes obratne transkriptaze in Taq DNA polimeraze, barvilo ROX in ddH₂O. Pri vsaki tipizacijski reakciji smo 5 µL vzorca RNA dodali 15 µL reakcijske mešanice.

Pomnoževanje za presejalne in tipizacijske reakcije je potekalo pod naslednjimi pogoji:

- 15 minut pri 50 °C,
- 2 minuti pri 95 °C,
- 40 ciklov po: 15 sekund pri 95 °C in 30 sekund pri 60 °C.

4. REZULTATI

4.1 VZORCI

Skupno smo pregledali 160 vzorcev, med katerimi je bilo 85 moških (53,1 %) in 75 žensk (46,9 %). Najmlajši preiskovanec je bil star 10 dni, najstarejši 80 let, največ je bilo mlajših od enega leta (slika 15). Med vzorci so bili brisi žrela, brisi nazofarinks, aspirati traheje, brisi nosu in tonsil (priloga A).



Slika 15: Število pacientov po posameznih starostnih skupinah

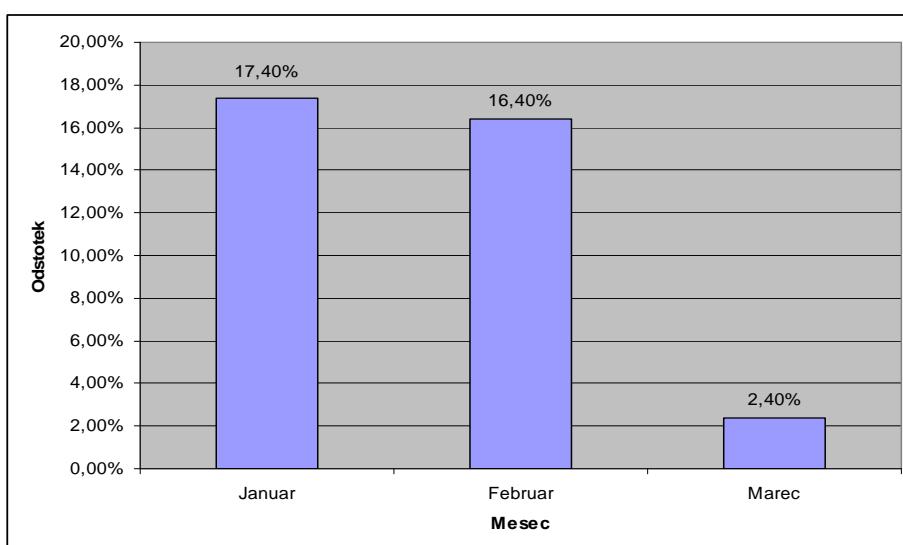
Največ vzorcev je bilo pregledanih februarja, najmanj marca (preglednica II).

Preglednica II: Število pregledanih vzorcev po mesecih

Januar	Februar	Marec
46	73	41

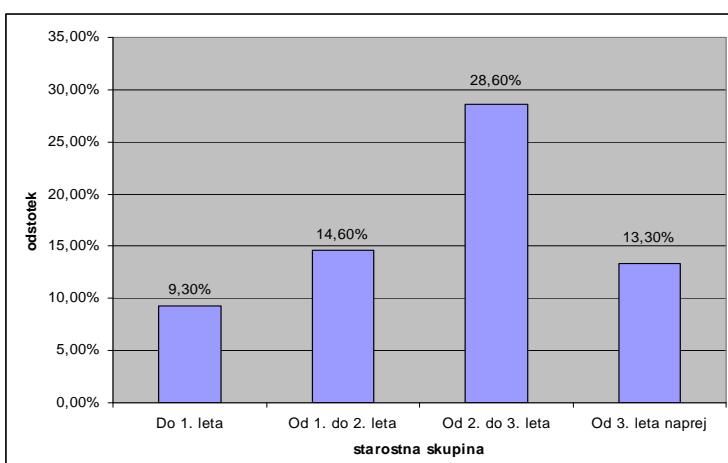
4.2 REZULTATI PRESEJALNEGA RT-PCR

Prisotnost humanega koronavirusa smo ugotovili pri 21 ali 13,1 % od 160 pregledanih vzorcev. Pozitivnih vzorcev je bilo največ februarja (12), manj januarja (8) in najmanj marca (1). Odstotek prekuženosti pa je bil najvišji januarja (17,4 %), manjši februarja (16,4 %) in najmanjši marca (2,4 %) (slika 16).



Slika 16: Odstotek pozitivnih vzorcev v posameznem mesecu

V starostni skupini do 1. leta je bilo 7 pozitivnih vzorcev, 6 v skupini od 1. do 2. leta, 4 v skupini od 2. do 3. leta in 4 med starejšimi. Največji odstotek (28,6 %) prekuženih smo ugotovili v starostni skupini od 2. do 3. leta (slika 17).



Slika 17: Odstotek pozitivnih vzorcev v posamezni starostni skupini

Pri ženskah smo ugotovili 14 ali 66,7 % pozitivnih vzorcev, pri moških pa 7 ali 33,3 %.

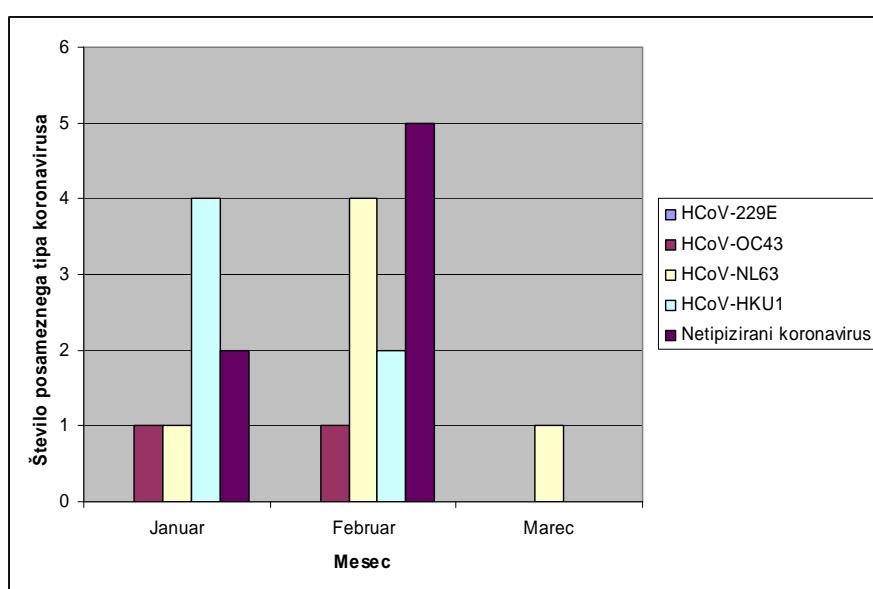
4.3 REZULTATI TIPIZACIJE

Vsem 21 pozitivnim vzorcem, ki smo jih dobili pri presejalnem RT-PCR, smo v ločenih reakcijah RT-PCR določali posamezen tip koronavirusa: 229E, OC43, NL63 in HKU1.

Tipa 229E nismo dokazali, tip OC43 smo dokazali v 2 vzorcih (9,5 %), tip NL63 v 6 (28,6 %) in tip HKU1 v 6 vzorcih (28,6 %). Pri 7 vzorcih s tipizacijskimi reakcijami nismo dokazali nobenega tipa koronavirusa (33,3 %) (preglednica III).

Preglednica III: Število in odstotek posameznih tipov koronavirusa po mesecih

	Januar	Februar	Marec	Skupaj	Skupaj odstotek
HCoV-229E	0	0	0	0	0
HCoV-OC43	1	1	0	2	9,5 %
HCoV-NL63	1	4	1	6	28,6 %
HCoV-HKU1	4	2	0	6	28,6 %
Netipizirani koronavirusi	2	5	0	7	33,3 %
Skupaj	8	12	1	21	100 %



Slika 18: Grafični prikaz pojavljanja posameznih tipov koronavirusa po mesecih

Pri nobenem preiskovancu nismo sočasno odkrili več kot enega tipa koronavirusa.

4.4 KOINFEKCIJE

Rezultate testov direktne imunofluorescence, ki so bili narejeni med rutinsko diagnostiko, smo primerjali z rezultati reakcije RT-PCR. Od 21 pozitivnih rezultatov smo koinfekcije ugotovili pri 9 preiskovancih (42,9 %), od katerih je bilo 7 okuženih z respiratornim sincicijskim virusom, 1 z virusom influence tipa A in 1 z adenovirusom. Koinfekcije z drugimi virusi pri posameznih tipih koronavirusov prikazuje preglednica IV.

Preglednica IV: Koinfekcije z drugimi virusi pri posameznih tipih koronavirusov

	RSV	Influenca A	Adenovirus
HCoV-229E	-	-	-
HCoV-OC43	1	0	0
HCoV-NL63	2	1	0
HCoV-HKU1	3	0	0
Netipizirani koronavirusi	1	0	1

Natančne podatke vseh pozitivnih rezultatov prikazuje preglednica V.

Preglednica V: Podrobni podatki o vzorcih, pri katerih smo dokazali koronavirusno okužbo

Datum sprejema	Starost	Spol	Vzorec	DIF	Corona	Tip
16. 2. 2007	4 leta	Ženski	b. žrela	A - pozitivno	pozitivno	netipiziran
22. 2. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	negativno	pozitivno	NL63
7. 2. 2007	2 leti	Ženski	b. NF	I A - pozitivno	pozitivno	NL63
16. 1. 2007	7 let	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	HKU1
2. 2. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	HKU1
6. 1. 2007	1 leto in 2 meseca	Ženski	AT	negativno	pozitivno	netipiziran
5. 2. 2007	4 mesece	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	netipiziran
12. 2. 2007	8 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	netipiziran
13. 2. 2007	1 leto in 3 mesece	Moški	b. žrela	negativno	pozitivno	netipiziran
27. 3. 2007	2 leti in 1 mesec	Ženski	b. NF	negativno	pozitivno	NL63
21. 2. 2007	3 leta	Moški	b. žrela	negativno	pozitivno	NL63
25. 1. 2007	18 let	Moški	b. NF	negativno	pozitivno	OC43
3. 1. 2007	1 leto in 6 mesecev	Moški	b. NF	RSV - negativno	pozitivno	HKU1
3. 1. 2007	2 meseca	Ženski	b. žrela	RSV - negativno	pozitivno	netipiziran
30. 1. 2007	1 leto	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	HKU1
29. 1. 2007	1 leto	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	HKU1
1. 2. 2007	2 leti in 6 mesecev	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	pozitivno	HKU1
6. 2. 2007	6 mesecev	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	netipiziran
18. 1. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	NL63
12. 2. 2007	2 leti in 4 mesece	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	pozitivno	NL63
23. 2. 2007	1 leto in 5 mesecev	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	pozitivno	OC43

Legenda: b. žrela: bris žrela; b. NF: bris nazofarinks; AT: aspirat traheje; A: adenovirus; IA: influenca A; RSV: respiratorni sincicijski virus

5. RAZPRAVA

Koronavirusi so skupina virusov z nenavadnim molekularnim mehanizmom transkripcije in replikacije. Izbruh SARS-a in identifikacija novega koronavirusa kot vzrok za to bolezen sta bila precejšnje presenečenje, saj je bil to prvi koronavirus, ki je bil nedvomno povezan s hudimi človeškimi obolenji (12). Posledično se je vzbudilo veliko zanimanje za to skupino virusov, in danes vemo, da človeka lahko okužijo vsaj še štirje tipi koronavirusov.

Pri uporabi metodologije v naši raziskavi smo se opirali na članek *Clinical Disease in Children Associated with Newly Described Coronavirus Subtypes*, ki je bil objavljen leta 2007 (19). Raziskava je bila v obdobju enega leta opravljena na 1.043 otrocih v Severni Ameriki.

Naše ugotovitve lahko najbolj zanesljivo primerjamo z rezultati te raziskave, saj smo uporabili enako metodo, enake oligonukleotidne začetnike, enake sonde za pomnoževanje tarčnega odseka in enake pogoje pomnoževanja.

V omenjeni raziskavi so ugotovili koronavirus pri 6,3 % pregledanih vzorcev. Od tega je 12,1 % pripadalo podtipu 229E, 16,7 % podtipu NL63, 28,8 % podtipu OC43 in 42,4 % podtipu HKU1. V nobenem vzorcu niso ugotovili več kot enega tipa koronavirusa.

V naši diplomski nalogi smo ugotovili koronaviruse pri 13,1 % preiskovancev, odstotek posameznih tipov je bil naslednji: 229E 0 %, NL63 28,6 %, OC43 9,5 % in HKU1 28,6 %. Odstotek netipiziranih koronavirusov je bil 33,3 %.

V raziskavi ameriških raziskovalcev, ki je trajala celo leto, so koronaviruse zaznali v vseh mesecih, razen julija. Največ pozitivnih vzorcev je bilo decembra, vendar je treba upoštevati, da so takrat tudi pregledali največ vzorcev.

V naši raziskavi, ki je potekala prve tri mesece leta 2007, smo največ pozitivnih vzorcev ugotovili februarja, vendar moramo pri interpretaciji rezultatov tudi upoštevati, da smo imeli v tem mesecu precej več vzorcev kot v drugih dveh.

Statističnih razlik med spoloma ni bilo niti v naši niti v ameriški raziskavi.

Pri pregledu in primerjavi rezultatov testiranja z metodo direktne imunofluorescence smo ugotovili, da je bila najpogostejsa koinfekcija z respiratornim sincicijskim virusom, in sicer kar pri 7 od 9 koinfekcij. Vsi preiskovanci, ki so bili sočasno okuženi s tem virusom, so bili stari manj kot 3 leta. To nikakor ni presenečnje, saj sezona tega virusa traja od začetka zime do zgodnje pomlad, torej je bil vrh sezone prav v času naše raziskave. Prve RSV okužbe so se v sezoni 2006/2007 pojavile v 42. tednu leta 2006. Sezona je trajala do 14. tedna leta 2007, vrh pa je dosegla v 5. tednu leta 2007 (52). Ob tem moramo dodati, da je RSV pozimi tudi najpogostejsa bolnišnična okužba na pediatričnih oddelkih in je to lahko dodaten vzrok za tako veliko število sočasnih okužb z virusom RSV.

Pomanjkljivost našega dela je bila, da pri RT-PCR metodi nismo uporabili interne kontrole. Za metode, ki temeljijo na reverzni transkripciji, primanjkuje stabilnih internih kontrol, zato je ta kontrola pogosto izpuščena, s čimer pa tvegamo lažno negativne rezultate. Primerna interna kontrola za metodo RT-PCR mora biti stabilna, homogena, ekonomična za izdelavo, nekužna, njeno zaporedje ne sme biti enako nobenemu zaporedju v kliničnemu vzorcu in mora omogočiti nadzor nad postopkom v vsakem trenutku. To pa je tehnično zelo zahtevno, saj je problem izdelava RNA verige, ki je obstojna na RNaze (53, 54).

Pri ameriški raziskavi so v analizo vključili le vzorce, pri katerih se je pomnožila tudi interna kontrola (98,3 %). Glede na primerljivost rezultatov lahko sklepamo, da tudi pri naši raziskavi obstaja možnost (1,7 %) lažno negativnih rezultatov. Tveganje pa ocenujemo kot minimalno, saj je lažno negativni rezultat možen pri manj kot 3 negativnih vzorcih.

Z diplomsko nalogo smo ugotovili, da so koronavirusi prisotni tudi v Sloveniji in obsegajo pomemben del okužb dihal, predvsem pri otrocih, zato bi jih bilo smotrno vključiti v redno diagnostiko. Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati, da prisotnost virusne RNA še ne pomeni prisotnosti kužnega virusa. Imunofluorescenčne metode so v primerjavi z

molekularnimi manj občutljive in manj specifične, poleg tega pa za ugotavljanje koronavirusov s temi metodami ni komercialno dostopnega testa.

Virusi so pomemben vzrok okužb dihal, predvsem pri otrocih. Vsako leto je približno 3 % otrok, mlajših od enega leta, sprejetih v bolnišnice zaradi zmerne ali resne okužbe spodnjih dihal (5). Le z raziskovanjem in spoznavanjem (novih) povzročiteljev ter razvijanjem novih metod lahko povečamo odstotek znanih povzročiteljev okužb in zmanjšamo odstotek hospitalizacije.

6. SKLEP

Z uporabo metode RT-PCR v realnem času smo ugotavljali koronaviruse pri 160 od 1.288 vzorcev, poslanih v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij v Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pozitiven rezultat smo ugotovili pri 13,1 % pregledanih vzorcev bolnikov z okužbo dihal v Sloveniji.

Najbolj pogosto dokazana genotipa koronavirusov sta bila NL63 in HKU1, manj pogost je bil genotip OC43, genotipa 229E pa v omejenem časovnem obdobju nismo uspeli dokazati.

Sočasno okužbo z drugim virusom smo odkrili pri 42,9 % bolnikov, najpogosteje z virusom RSV.

Menimo, da bi metodo RT-PCR lahko uvedli v redno rutinsko diagnostiko, z nadaljnjo optimizacijo reakcije in dodatkom ustrezne interne kontrole.

VIRI

1. Gillim Ross L, Subbarao K: Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clinical microbiology reviews* 2006; 19: 614–636
2. Rezza G, Valdarchi C, Puzelli S, Ciotti M, Farchi F, Fabiani C, Calzoletti L, Donatelli I, Perno CF: Respiratory viruses and influenza-like illness: a survey in the area of Rome, winter 2004–2005. *Euro surveill* 2006; 11: 251–253
3. Arden EK, McErlean P, Nissen DM, Sloots PT, Mackay MI: Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocaviruses during acute respiratory tract infection. *Journal of medical virology* 2006; 78: 1232–1240
4. Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Olivera TFM, Silveira HL, Nepomuceno LL, Moreira LS, Dyonisio G, Rossi LMG, Olivera RC, Ribeiro LZG, Queiroz DAO: Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006, 101: 301–306
5. Woensel JBM, Van Aalderen WMC, Kimpfen JLL: Viral lower respiratory tract infections in infants and young children. *British medical journal* 2003; 327: 36–40
6. Falsey RA, Walsh EE., Hayden GF: Rhinovirus and coronavirus infection – associated hospitalizations among older adults. *The journal of infectious disease* 2002; 185: 1338–1341
7. El-Sahly MH, Atmar LR, Glezen PW, Greenberg BS: Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with "common cold" virus infections. *Clinical infectious disease* 2000; 31: 96–100
8. Kahn SJ: Newly discovered respiratory viruses: significance and implications. *Current opinion in pharmacology* 2007; 7: 478–483

9. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J: Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *Journal of virology* 2006; 78: 1498–1504
10. Gorbalenya EA, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder JE: Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus research* 2006; 117: 17–37
11. Wagner KE, Hewlett JM: Basic virology. Blackwell Science 1999: 60–62, 234, 270
12. Weiss RS, Navas-Martin S: Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and molecular biology reviews* 2005; 69: 635–664
13. Schütze H, Ulferts R, Schelle B, Bayer S, Granzow H, Hoffmann B, Mettenleiter CT, Ziebuhr J: Characterization of white bream virus reveals a novel genetic cluster of nidoviruses. *Journal of virology* 2006; 80: 11598–11609
14. McIntosh K, JH Dees, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM: Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the national academy of sciences* 1967; 57: 933–940
15. Kahn JS, McIntosh K: History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatric infectious disease journal* 2005; 24: 223–227
16. He Y, Li J, Li W, Lustigman S, Farzan M, Jiang S: Cross-neutralization of human and palm civet severe acute respiratory syndrome coronavirus by antibodies targeting the receptor-binding domain of spike protein. *The journal of immunology* 2006; 176: 6085–6092

17. Pyrc K, Berkhout B, Van der Hoek L: The novel human coronavirus NL63 and HKU1. *Journal of virology* 2007; 81: 3051–3057
18. Vabret A, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Corbet S, Freymuth F: Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clinical infectious diseases* 2006; 42: 634–639
19. Kuypers J, Martin ET, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund JA: Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics* 2007; 119: e70–e76
20. Vijgen L, Keyaerts E, Moës A, Maes P, Duson G, Van Ranst M: Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assay for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43: 5452–5456
21. Van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Überla K: Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLOS Medicine* 2005; 2: e240
22. Esper F, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS: Association between a novel coronavirus and kawasaki disease. *Journal of infectious diseases* 2005; 191: 499–502
23. Dominguez SR, Anderson MS, Golde MP, Robinson CC, Holmes KV: Blinded case-control study of the relationship between human coronavirus NL63 and kawasaki syndrome. *The journal of infectious diseases* 2006; 194: 1697–1701
24. Trampuž A, Rezar L, Tomič V, Muzlovič I: SARS (hudi akutni respiratorni sindrom) – nov izziv za človeštvo. *Zdravniški vestnik* 2003; 72: 453–460

25. Thomas PA: Severe acute respiratory syndrome. Indian journal of medical microbiology 2003; 21:152–160
26. Strle F: SARS – sindrom akutnega oteženega dihanja. Zdravniški vestnik 2003; 72: 409–410
27. Stannard W, O'Callaghan C.: Management of croup. Pediatric drugs 2002; 4: 231–240
28. Shimizu C, Shike H, Baker SC, Garcia F, Van der Hoek L, Kuijpers TW, Reed SL, Rowley AH, Shulman ST, Talbot HKB, Williams JV, Burns JC: Human coronavirus NL63 is not detected in the respiratory tract of children with acute kawasaki disease. The journal of infectious diseases 2005; 192: 1767–1771
29. Pyrc K, Dijkman R, Deng L, Jebbink MF Ross, HA, Nerkhout B, Van der Hoek L: Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. Journal of molecular biology 2006; 364: 964–973
30. Jan Bosch B, Van der Zee R, Haan CAM, Rottier PJM: The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. Journal of virology 2003; 77: 8801–8811
31. Pyrc K, Jebbink MF, Berkhout B, Van der Hoek L: Genome structure and transcriptional regulation of human coronavirus NL63. Virology journal 2004; 1:7
32. Lachance C, Arbour N, Cashman NR, Talbot PJ: Involvement of aminopeptidase N (CD13) in infection of human neural cells by human coronavirus 229E. Journal of virology 1998; 72: 6511–6519
33. Nomura R, Kiyota A, Suzuki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T, Fujimoto T: Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. Journal of virology 2004; 78: 8701–8708

34. Koren S, Avšič Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M: Splošna medicinska virologija. Medicinski razgledi 2002; 26, 39–41
35. Tijms MA, Van Dinten LC, Gorbaly AE, Snijder EJ: A zinc finger-containing papain-like protease couples subgenomic mRNA synthesis to genome translation in a positive-stranded RNA virus. Proceedings of the national academy of sciences 2001; 98: 1889–1894
36. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG: A contemporary view of coronavirus transcription. Journal of virology 2007; 81: 20–29
37. Minskaia E, Hertzig T, Gorbaly AE, Campanacci V, Cambillau C: Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. Proceedings of the national academy of sciences 2006; 103: 5108–5113
38. Woo PCY, Lau SKP, Yip CCY, Huang Y, Tsui HW, Kwok-Hung C, Kwok-Yung Y: Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. Journal of virology 2006; 80: 7136–7145
39. Mackay IM: Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection 2004; 10: 190–212
40. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (19.5.2008)
41. Meisenberg G, Simmons WH: Principles of medical biochemistry, Mosby, St. Louis, 1998: 192–193
42. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR, Smith TF: Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical microbiology reviews 2006; 19: 165–256

43. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A: Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research* 2002; 30: 1292–1305
44. Bustin SA, Mueller R: Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical science* 2005; 109: 365–379
45. Lukhtanov EA, Lokhov SG, Gorn VV, Podyminogin MA, Mahoney W: Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic acids research* 2007; 35: e30
46. http://www.farma-drustvo.si/gradivo.php?b=gradivo_p%2FIzbrana+poglavlja+farmacevtske+biotehnologije%2Fpredavanja2007_2008 (19. 5. 2008)
47. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell, Garland science, New York, 2002: 503
48. Vozelj M: Imunologija – enciklopedijski priročnik, DZS, Ljubljana, 1996: 136
49. Dragaš AZ: Mikrobiologija z epidemiologijo, DZS, Ljubljana, 1998: 65
50. Berensmeir S: Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology* 2006; 73: 495–504
51. Paulssen RH, Olsen L, Sogn TC: MagNa Pure Compact RNA Isolation Kit: isolation of high-quality total RNA from broad range of sample material. *Biochemica* 2006; 2: 14–18
52. Sočan M, Petrovec M, Berginc N, Drinovec N, Eberl-Gregorič E, Fišer J, Harlander T, Juriševič-Dodič A, Deželak Kramberger P, Žohat Čretnik T: Uvedba laboratorijskega spremmljanja respiratornega sincicijskega virusa v Sloveniji. *Zdravstveno varstvo* 2008; 47: 1–7

53. Villanova GV, Gardio D, Taborda M A, Reggiardo V, Tanno H, Rivadeneira ED, Perez G R, Giri AA: Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology* 2007; 45: 3555–3563
54. Dingle KE, Crook D, Jeffery K: Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology* 2004; 42: 1003–1011

PRILOGE

Priloga A: Seznam 160 naključno izbranih vzorcev, ki smo jih testirali z metodo RT-PCR v realnem času.

Datum sprejema	Starost	Spol	Vzorec	DIF	Corona	Tip
6. 1. 2007	1 leto in 2 meseca	Ženski	AT	negativno	pozitivno	netipiziran
16. 3. 2007	8 mesecev	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
17. 3. 2007	32 let	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
19. 3. 2007	1 leto in 8 mesecev	Ženski	b. žrela	A, RSV - pozitivno	negativno	-
19. 3. 2007	19 let	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
20. 3. 2007	3 leta in 6 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
21. 3. 2007	9 mesecev	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
22. 3. 2007	14 let	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
22. 3. 2007	1 leto in 7 mesecev	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
22. 3. 2007	17 let	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
23. 3. 2007	4 mesece	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
24. 3. 2007	2 meseca	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
25. 3. 2007	1 leto in 5 mesecev	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
26. 3. 2007	2 leti	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
27. 3. 2007	2 leti in 1 mesec	Ženski	b. NF	negativno	pozitivno	NL63
27. 3. 2007	1 leto in 6 mesecev	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
28. 3. 2007	1 leto in 6 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
28. 3. 2007	2 leti in 6 mesecev	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
29. 3. 2007	8 mesecev	Moški	bris	RSV - pozitivno	negativno	-
30. 3. 2007	3 leta in 11 mesecev	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
30. 3. 2007	8 let	Moški	b. tonsil	negativno	negativno	-
31. 3. 2007	2 leti in 10 mesecev	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
31. 3. 2007	2 leti in 7 mesecev	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
31. 3. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
1. 1. 2007	1 leto	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
3. 1. 2007	2 leti in 2 meseca	Moški	b. žrela	A - pozitivno	negativno	-
3. 1. 2007	1 leto in 6 mesecev	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
3. 1. 2007	2 meseca	Ženski	AT	negativno	negativno	-
3. 1. 2007	2 meseca	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	netipiziran
3. 1. 2007	1 mesec	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
3. 1. 2007	1 leto in 8 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
3. 1. 2007	1 leto in 7 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
3. 1. 2007	1 leto in 6 mesecev	Moški	b. NF	RSV - negativno	pozitivno	HKU1
5. 1. 2007	1 leto	Moški	b. nosu	negativno	negativno	-

Datum sprejema	Starost	Spol	Vzorec	DIF	Corona	Tip
6. 1. 2007	1 leto in 2 meseca	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
7. 1. 2007	1 leto in 9 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
8. 1. 2007	4 mesece	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
9. 1. 2007	7 mesecev	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
10. 1. 2007	1 mesec	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
11. 1. 2007	7 mesecev	Ženski	aspirat iz kanile	negativno	negativno	-
12. 1. 2007	3 leta	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
13. 1. 2007	2 leti	Moški	b. NF	RSV - negativno	negativno	-
15. 1. 2007	2 leti	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
16. 1. 2007	28 let	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
16. 1. 2007	7 let	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	HKU1
17. 1. 2007	7 mesecev	Ženski	b. NF	IA - pozitivno	negativno	-
17. 1. 2007	3 mesece	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
18. 9. 2007	4 mesece	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
18. 1. 2007	36 let	Moški	b. NF	RSV – pozitivno	negativno	-
18. 1. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	NL63
19. 1. 2007	80 let	Moški	b. nosu	negativno	negativno	-
19. 1. 2007	8 mesecev	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
19. 1. 2007	6 let	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
19. 1. 2007	4 leta	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
20. 1. 2007	3 leta	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
21. 1. 2007	1 leto in 3 mesece	Moški	b. žrela	A, RSV - pozitivno	negativno	-
22. 1. 2007	11 let	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
24. 1. 2007	12 let	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
25. 1. 2007	11 mesecev	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
25. 1. 2007	18 let	Moški	b. NF	negativno	pozitivno	OC43
26. 1. 2007	1 leto in 4 mesece	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
27. 1. 2007	4 leta in 3 mesece	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
27. 1. 2007	2 leti in 3 mesece	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
28. 1. 2007	3 mesece	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
30. 1. 2007	1 leto	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	HKU1
31. 1. 2007	1 leto	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
31. 1. 2007	4 mesece	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
29. 1. 2007	1 leto in 3 mesece	Moški	b. žrela	RSV - negativno	negativno	-
29. 1. 2007	1 leto	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	HKU1
31. 1. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
1. 2. 2007	2 leti in 6 mesecev	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	pozitivno	HKU1
1. 2. 2007	5 mesecev	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
2. 2. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
2. 2. 2007	8 mesecev	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-

Datum sprejema	Starost	Spol	Vzorec	DIF	Corona	Tip
2. 2. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	HKU1
3. 2. 2007	2 leti	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
5. 2. 2007	3 mesece	Moški	bris	negativno	negativno	-
5. 2. 2007	1 leto in 10 mesecev	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
5. 2. 2007	4 mesece	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
5. 2. 2007	4 mesece	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	netipiziran
6. 2. 2007	1 leto in 8 mesecev	Moški	b. žrela	IA - pozitivno	negativno	-
6. 2. 2007	6 mesecev	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	pozitivno	netipiziran
7. 2. 2007	5 let	Moški	b. žrela	Negativno	negativno	-
7. 2. 2007	4 mesece	Ženski	b. žrela	Negativno	negativno	-
7. 2. 2007	1 leto in 3 mesece	Moški	b. žrela	A - pozitivno	negativno	-
7. 2. 2007	2 leti	Ženski	b. NF	IA - pozitivno	pozitivno	NL63
7. 2. 2007	3 mesece	Moški	b. žrela	RSV - negativno	negativno	-
8. 2. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
8. 2. 2007	1 mesec	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
9. 2. 2007	1 leto in 7 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
9. 2. 2007	5 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
10. 2. 2007	31 let	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
11. 2. 2007	14 let	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
12. 2. 2007	8 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	pozitivno	netipiziran
12. 2. 2007	2 leti in 4 mesece	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	pozitivno	NL63
12. 2. 2007	2 leti	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
13. 2. 2007	1 leto in 3 mesece	Moški	b. žrela	negativno	pozitivno	netipiziran
13. 2. 2007	10 dni	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
14. 2. 2007	2 leti	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
14. 2. 2007	1 leto in 9 mesecev	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
15. 2. 2007	1 mesec	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
15. 2. 2007	29 let	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
16. 2. 2007	3 leta	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
16. 2. 2007	4 leta	Ženski	b. žrela	A - pozitivno	pozitivno	netipiziran
16. 2. 2007	43 let	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
16. 2. 2007	11 let	Moški	b. NF	IA - pozitivno	negativno	-
16. 2. 2007	2 tedna	Ženski	AT	RSV - pozitivno	negativno	-
16. 2. 2007	6 let	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
17. 2. 2007	9 let	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
17. 2. 2007	14 let	Ženski	b. NF	negativno	negativno	-
19. 2. 2007	9 let	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
19. 2. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	IA - pozitivno	negativno	-
19. 2. 2007	8 let	Moški	b. NF	IA - pozitivno	negativno	-
19. 2. 2007	1 leto in 7 mesecev	Ženski	b. žrela	IA - pozitivno	negativno	-

Datum sprejema	Starost	Spol	Vzorec	DIF	Corona	Tip
19. 2. 2007	3 mesece	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
19. 2. 2007	1 mesec	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
20. 2. 2007	39 let	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
20. 2. 2007	1 leto	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
20. 2. 2007	7 mesecev	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
21. 2. 2007	3 leta	Moški	b. žrela	negativno	pozitivno	NL63
21. 2. 2007	1 mesec	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
21. 2. 2007	1 leto	Ženski	b. NF	IA - pozitivno	negativno	-
21. 2. 2007	4 mesece	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
21. 2. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
22. 2. 2007	3 leta	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
22. 2. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	IA - pozitivno	negativno	-
22. 2. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	negativno	pozitivno	NL63
23. 2. 2007	1 leto in 5 mesecev	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	pozitivno	OC43
23. 2. 2007	9 mesecev	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
23. 2. 2007	1 leto	Moški	b. NF	negativno	negativno	-
23. 2. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
23. 2. 2007	1 leto in 4 mesece	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
23. 2. 2007	9 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
24. 2. 2007	10 dni	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
24. 2. 2007	4 mesece	Moški	b. nosu	negativno	negativno	-
26. 2. 2007	4 mesece	Moški	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
26. 2. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
26. 2. 2007	3 mesece	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
27. 2. 2007	6 mesecev	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
27. 2. 2007	1 leto in 4 mesece	Ženski	AT	negativno	negativno	-
27. 2. 2007	3 mesece	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
28. 2. 2007	1 leto in 7 mesecev	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
28. 2. 2007	1 leto 3 mesece	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
1. 3. 2007	1 mesec	Moški	bris	RSV - pozitivno	negativno	-
2. 3. 2007	1 leto in 7 mesecev	Moški	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
5. 3. 2007	1 mesec	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
3. 3. 2007	2 tedna	Ženski	AT	RSV - pozitivno	negativno	-
4. 3. 2007	3 mesece	Ženski	b. NF	RSV - pozitivno	negativno	-
5. 3. 2007	1 mesec	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
6. 3. 2007	3 leta	Ženski	AT	negativno	negativno	-
7. 3. 2007	1 mesec	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
7. 3. 2007	1 mesec	Ženski	b. žrela	RSV - pozitivno	negativno	-
8. 3. 2007	1 leto in 3 mesece	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
8. 3. 2007	1 leto	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-

Datum sprejema	Starost	Spol	Vzorec	DIF	Corona	Tip
9. 3. 2007	1 leto	Ženski	b. žrela	A - pozitivno	negativno	-
12. 3. 2007	2 meseca	Ženski	b. žrela	P3 - pozitivno	negativno	-
12. 3. 2007	7 mesecev	Moški	AT	RSV - pozitivno	negativno	-
13. 3. 2007	7 mesecev	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-
15. 3. 2007	8 mesecev	Ženski	b. žrela	negativno	negativno	-
15. 3. 2007	8 mesecev	Moški	b. žrela	negativno	negativno	-

Legenda: b. žrela: bris žrela; b. NF: bris nazofarinks; b. tonzil: bris tonzil; b. nosu: bris nosu; AT: aspirat tracheje; A: adenovirus; IA: influenca A; RSV: respiratorni sincicijski virus; P3: virus parainfluenza 3