

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA BEVC

PRIMERJAVA TREH METOD ZA DOKAZOVANJE RESPIRATORNEGA
SINCICIJSKEGA VIRUSA

COMPARISON OF THREE METHODS FOR DETECTION OF RESPIRATORY
SYNCYTIAL VIRUS

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2010

Praktično delo v okviru diplomske naloge sem izvajala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, ki mi je omogočil izvedbo diplomske naloge in me usmerjal med pisanjem in vzpodbujal. Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki so mi pomagali pri praktičnem delu diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi vsem mojim bližnim, ki so me podpirali in vzpodbujali, med študijem in pri pisanju diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo napisala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca.

KAZALO

| | |
|---|--------|
| Povzetek | - 1 - |
| ABSTRACT | - 2 - |
| SEZNAM OKRAJŠAV | - 3 - |
| 1. UVOD | - 4 - |
| 1.1 DRUŽINA Paramyxoviridae | - 5 - |
| 1.2 ZGODOVINA | - 5 - |
| 1.3 RESPIRATORNI SINCICIJSKI VIRUS | - 5 - |
| 2. NAMEN DELA | - 7 - |
| 3. MATERIALI IN METODE | - 8 - |
| 3.1 VZORCI | - 8 - |
| 3.2 LABORATORIJSKA OPREMA | - 8 - |
| 3.3 REAGENTI ZA IZOLACIJO RNA | - 10 - |
| 3.4 REAGENTI ZA REAKCIJO RT-PCR | - 11 - |
| 4.1 METODA DIREKTNE IMUNOFLUORESCENCE | - 12 - |
| 4.2 HITRI IMUNOKROMATOGRAFSKI TEST | - 13 - |
| 4.3 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN | - 15 - |
| 4.4 DETEKCIJA RESPIRATORNO SINCICIJSKEGA VIRUSA V REALNEM ČASU Z RT-PCR | - 17 - |
| 4.4.1 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO, RT-PCR V REALNEM ČASU | - 17 - |
| 5. REZULTATI | - 21 - |
| 5.1 VZORCI | - 21 - |
| 5.2 REZULTATI METODE DIREKTNE IMUNOFLUORESCENCE | - 22 - |
| 5.3 REZULTATI TESTIRANJA S HITRIM TESTOM | - 22 - |
| 5.4 REZULTATI REAKCIJE PCR | - 23 - |
| 5.5 REZULTATI PRIMERJAV TESTIRANJA S TREMI RAZLIČNIMI METODAMI | - 23 - |
| 5.6. REZULTATI VREDNOSTI Ct | |
| 6. RAZPRAVA | - 26 - |
| 7. SKLEPI | - 29 - |
| 8. LITERATURA | - 30 - |
| 9. LITERATURA SLIK | - 32 - |

KAZALO SLIK

| | |
|--|--------|
| Slika 1: Prikaz virusa RSV z elektronskim mikroskopom | - 6 - |
| Slika 2: Shematski prikaz zgradbe virusa RSV. A-matrica virusa, B-virusna kapsida, C-transmembranski proteini | - 6 - |
| Slika 3: Biološka varnostna komora za pripravo vzorcev na analizo PCR. | - 9 - |
| Slika 4: Kartuša, ki se uporablja za izolacijo nukleinskih kislin | - 10 - |
| Slika 5: Nastavki za pipetiranje..... | - 10 - |
| Slika 6: Prikaz primera detekcije antigenov virusa RSV z metodo direktne imunofluorescence | - 12 - |
| Slika 7: Shematski prikaz metode DIF..... | - 13 - |
| Slika 8: Hitri test, Binax NOW RSV..... | - 14 - |
| Slika 9: Shema, ki prikazuje nanos vzorca..... | - 15 - |
| Slika 10: Aparatura MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Švica) | - 16 - |
| Slika 11: Shematski prikaz osamitve nukleinskih kislin | - 16 - |
| Slika 12: shema prikazuje splošen potek verižne reakcije s polimerazo | - 17 - |
| Slika 13: Step one aparatura za izvedbo PCR v realnem času. | - 18 - |
| Slika 14: Shema temperaturnega profila ciklov reakcije PCR | - 21 - |
| Slika 15: Grafični prikaz pozitivnih rezultatov testiranja s tremi testi za diagnostiko okužb z RSV. DIF- metoda direktne imunofluorescence, HT- hitri imunskokromatografski test, PCR- verižna reakcija s polimerazo..... | - 25 - |

KAZALO TABEL

| | |
|--|--------|
| Tabela I: preiskovani vzorci razporejeni glede na vzorec in starost pacientov | - 21 - |
| Tabela II: preiskovalni vzorci so razporejeni glede na starost preiskovalcev in rezultate testiranj z DIF | - 22 - |
| Tabela III: preiskovalni vzorci razporejeni glede na rezultate testiranja s hitrim testom glede na starost pacientov | - 22 - |
| Tabela IV: Preiskovani vzorci razporejeni glede na starost preiskovalcev in rezultate testiranj s PCR | - 23 - |
| Tabela V: preglednica razmerij med posameznimi uporabljenimi termini za izračun občutljivosti in specifičnosti posameznih testov | - 24 - |

Povzetek

Respiratorni sincicijski virus je najpogostejši povzročitelj okužb spodnjih dihal pri otrocih do prvega leta starosti. Med najbolj ogroženimi so prezgodaj rojeni in otroci, ki bolehalo za kronično pljučno boleznijo. Znaki okužbe z respiratornim sincicijskim virusom so vročina, kašelj in izcedek iz nosu. Virus povzroča vsakoletne epidemije v zimskem obdobju, po celem svetu in je zelo nalezljiv. Povzroča bronhiolitis in pljučnico.

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kako primeren je hitri kromatografski test za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa pri otrocih mlajših od 5 let. Rezultate hitrih testov smo primerjali z rezultati, ki smo jih pridobili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in z rezultati antigenskih testov z direktno imunofluorescenco.

Vse tri teste smo izvedli pri 129 bolnikih mlajših od 5 let. S hitrim kromatografskim testom smo določili 109 negativnih vzorcev in 20 pozitivnih vzorcev. Z metodo PCR je bilo 81 vzorcev negativnih in 48 vzorcev pozitivnih. Primerjava rezultatov je pokazala, da je bilo s hitrim kromatografskim testom kar 30 vzorcev lažno negativnih. Pri dveh vzorcih, ki sta bila pozitivna pri testiranju s hitrim testom z metodo PCR nismo mogli potrditi rezultata.

Ugotovili smo, da je večino okužb z RSV povzročil genotip A. Glede na rezultate menimo, da bi morala biti uporaba hitrega testa za dokazovanje okužb z virusom RSV omejena le na ustanove, kjer lahko rezultat preverimo tudi z drugimi bolj občutljivimi metodami kot sta direktna imunofluorescenca in PCR.

Določili smo tudi občutljivost in specifičnost za vsako metodo posebej. Občutljivost za hitri test je bila 40%, specifičnost pa je bila 100%. Pri metodi DIF je bila 82% občutljivost, specifičnost je bila 98,7%. Občutljivost za metodo PCR je bila 96%, specifičnost je bila 100%.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is the most frequent cause of lower respiratory tract infections in children in the first year of life. The most affected and at risk for severe infection are prematurely born children and children with chronic respiratory diseases. The symptoms of infection with respiratory syncytial virus are fever, cough and rhinitis. The virus causes epidemics every winter all over the world and it is highly contagious. Clinically the virus manifests as bronchiolitis and pneumonia.

With our work, we wanted to ascertain usefulness of the quick test for detection of RSV antigens in testing children under the age of five years. The results of these tests were compared to results obtained by antigen detection with direct immunofluorescence method and polymerase chain reaction (PCR).

We have tested 129 patients under the age of five. Results of quick test revealed 109 negative and 20 positive results. With polymerase chain reaction we determined 81 samples that were negative and 48 positive for the presence of RSV RNA. Quick test revealed 20 correct and 30 false negative results and 2 positive results which could not be confirmed by PCR.

Most infections in our study population were caused by genotype A, variant of RSV. According to our results we suggest that use of quick tests for RSV antigen detection should be restricted only to institutions where more sensitive methods such as DIF and PCR are readily available.

We determined the sensitivity and specificity for each method separately. Sensitivity of rapid test was 40%, specificity was 100%. In the method, DIF was 82% sensitivity, specificity was 98.7%. The sensitivity of the PCR method was 96%, specificity was 100%.

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa,
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

SEZNAM OKRAJŠAV

RSV- respiratorni sincicijski virus

PCR- verižna reakcija s polimerazo

DIF- direktna imunofluorescenca

Ct- prehodna točka zaporednega števila cikla, katerega fluorescenca barvila prvič preseže
izračunano stopnjo ozadja

DNA- deoksiribonukleinska kislina

RNA- ribonukleinska kislina

RT- reverzna transkriptaza

1. UVOD

Okužbe dihal, pri otrocih, starostnikih in pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom, so najpogostejši vzrok za obolevnost in smrtnost na svetu. Med najpogostejšimi povzročitelji okužb je ob virusu gripe in adenovirusih, tudi respiratorni sincicijski virus (RSV). Pri odraslih osebah in šolarjih okužba največkrat poteka v blažji obliki vnetja zgornjih dihal (1). V drugih starostnih skupinah poteka bolezen s težjo klinično sliko. Tudi zdravljenje je zato bolj zapleteno, včasih je potrebna tudi hospitalizacija. Navadno gre pri hudih okužbah z RSV za otroke do enega leta starosti, prezgodaj rojene otroke, otroke s kronično pljučno boleznijo in s prirojeno srčno napako, starostnike in osebe z oslabljenim imunskim sistemom (2). Če pride do večjih zapletov, lahko okužba vodi v smrt (3). Virusne okužbe dihal predstavljajo velik zdravstveni problem pri otrocih starih do 2 leti, povsod po svetu (4). Respiratorni sincicijski virus je razširjen povsod in je znan, kot eden glavnih virusov, ki povzroča okužbe dihal (3). Najpogosteje prizadene spodnja dihala. Do prvega leta se z njimi okuži do 70% otrok, do drugega leta pa skoraj vsi. V zimskem obdobju lahko med epidemijo povzroča 30-50% vseh obolenj dihal (5). Starejši dojenčki in otroci zbolijo z blažjo obliko okužb dihal, kot otroci mlajši od 6 mesecev. Okužbe zgornjih dihal z virusom RSV, so bolj nevarne kot navaden prehlad, ki ga povzročajo rinovirusi (6). Klinični znaki akutne bolezni dihal so zlahka prepoznavni, med tem ko je vzroke za okužbo težje ugotoviti. Najpogostejši klinični znaki so vnetje nosne sluznice, kašelj in pogosto ima bolnik tudi vročino, lahko tudi oteženo dihanje in sopenje, ki sta pogosta predvsem pri novorojenčkih. Raziskave so pokazale, da je respiratorni sincicijski virus velikokrat povezan z bronhiolitisom in s pljučnico, ter je pomemben povzročitelj okužb spodnjih dihal (7). RSV je najpogostejši vzrok virusne pljučnice pri otrocih mlajših od 5 let, lahko pa povzroči pljučnico tudi pri starejših osebah in imunsko oslabljenih osebah (8). Okužba dihal se ponavadi začne z nosnim izcedkom, kašljem, pogosto tudi z vročino. Po nekaj dnevih se okužba prenese na spodnja dihala in se kaže kot dihalna stiska (9). To stanje predvsem ogroža majhne dojenčke. Pojav okužbe dihal je najpogostejši pri otrocih. S starostjo pogostost bolezni dihal pada in se spet poveča v starosti (10).

Virus se prenaša kapljično (kašljanje in kihanje), z onesnaženimi rokami, s stikom s predmeti (10).

1.1 DRUŽINA *Paramyxoviridae*

Družina *Paramyxoviridae* je razdeljena v dve podružini in sicer *Paramyxovirinae* in *Pneumovirinae*. *Paramyxovirinae* je razdeljena na pet rodov: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Morbillivirus* in *Henipavirus*. Poddružina *Pneumovirinae* je razdeljena na dva rodova in sicer na *Pneumovirus* in *Metapneumovirus*.

Predstavniki te družine so najpogostejši vzrok okužbe dihal pri otrocih. Vsi predstavniki, razen mumpsa in ošpic, so omejeni na celice dihal (11).

1.2 ZGODOVINA

Pred približno 150 leti so poskušali opisati znake in simptome okužbe z virusom RSV. Opisali so jih kot kongestivno kataralno vročino. Leta 1941 so prvič opisali epidemiološke vzorce pojavljanja bolezni. Med obdobjem med leti 1950 in 1960 je Robert M. Chanock izoliral virus in pojasnil njegove osnovne biološke značilnosti. Prav tako je ugotovil, da je enak virusu, ki povzroča okužbe dihal pri šimpanzih v ujetništvu. Predlagal je tudi ime virusa respiratorni sincicijski virus, ki temelji na opisu sprememb celic v dihalih. Leta 1960 je bil virus tudi uradno priznan, saj so ga odkrili za krivca številnih okužb pri novorojenčki in otrocih.

Ribavirin je zdravilo, ki so ga odkrili v osemdesetih letih prejšnjega stoletja. Uporablja se samo pri hudih okužbah dojenčkov in osebah z oslabljenim imunskim sistemom (3).

1.3 RESPIRATORNI SINCICIJSKI VIRUS

Virion je po obliki in velikosti heterogen. Obstajata dve tipični obliki viriona, to sta oblika ledvice in okrogla oblika. Premer virionov je 150-250 nm, njihovi filamenti so lahko dolgi do 15 μ m (12). Virion obdaja virusna ovojnica, ki je sestavljena iz dveh slojev lipoproteinov. Znotraj viriona se nahaja enovijačna RNA molekula, ki sestavlja 10 virusnih proteinov. Dva od teh sta nestrukturna proteina, ostalih 8 je strukturnih proteinov. Nestrukturna proteina usmerjata virusno replikacijo znotraj gostiteljske celice.

Strukturni proteini so razdeljeni v tri funkcijske skupine:

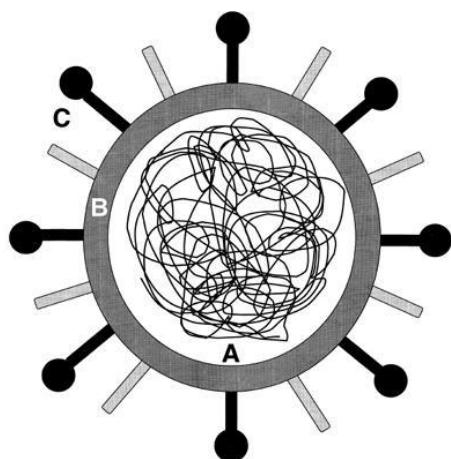
- Matrica je zgrajena iz dveh membran-združenih proteinov,
- Trije proteini gradijo virusno kapsido,
- Trije so tudi površinski transmembranski glikoproteini.

Dva od glikoproteinov sta združitevni F, protein in pritrdilni, G, protein, ki sta odgovorna za širjenje RSV okužbe. RSV-A in RSV-B, ki sta podtipa RSV virusa, se med seboj razlikujeta po poziciji G proteina, med tem, ko se protein F nahaja med dvema ožinama.

(13).



Slika 1: Prikaz virusa RSV z elektronskim mikroskopom



Slika 2: Shematski prikaz zgradbe virusa RSV. A-matrica virusa, B-virusna kapsida, C-transmembranski proteini

2. NAMEN DELA

Okužbe z virusom RSV se pojavljajo v zimskem času v velikih epidemijah, ki predstavljajo za zdravstvo velik materialni in organizacijski problem. Hitra in natančna laboratorijska diagnostika okužbe z RSV je nujna, ker je na podlagi klinične slike težko postaviti pravilno etiološko diagnozo. Tudi druge virusne okužbe namreč potekajo s podobnimi kliničnimi znaki. Trenutno najbolj uveljavljena metoda dokaza virusnih antigenov RSV je metoda direktne imunofluorescence. Metoda je dobro občutljiva in specifična a žal zahteva visoko usposobljeno osebje z izkušnjami, razmeroma drago opremo, izvedba pa traja približno 90 minut. Visoko občutljiva in specifična je tudi metoda verižne reakcije s polimerazo, ki pa je prav tako tehnično zahtevna in draga za izvedbo, ki traja vsaj 150 minut. S tehnološkega vidika bi bili zato zelo ugodni tako imenovani hitri testi, ki temeljijo na principu imunokromatografije. V mikrobiološki diagnostiki bi ob zadovoljivih parametrih specifičnosti in občutljivosti lahko predstavljali zelo pomemben del diagnostike. V naši nalogi smo imeli cilj ugotoviti kakšna je občutljivost in specifičnost hitrih testov BinaxNow za dokaz antigenov virusa RSV in kako jih lahko po učinkovitosti primerjamo s test DIF in PCR.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V času od 1.1.2009 in do 13.1.2009 je v laboratorij za diagnostiko virusnih bolezni na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, prispelo 129 vzorcev iz celotne Slovenije na diagnostiko virusnih povzročiteljev okužb dihal. Za našo raziskavo smo uporabili vzorce preiskovancev mlajših od 5 let, obeh spolov.

Vzorci, ki smo jih preiskovali so bili brisi nazofarinksa, nosu in žrela. Vzorce smo po tem, ko je bil opravljen rutinski test direktne imunofluorescence shranili v zmrzovalniku pri -20°C. Pred uporabo smo vzorce odmrznili na sobni temperaturi in jih dobro pretresli, da smo dobili homogeno suspenzijo celic. Za vse vzorce je bil narejen test z direktno imunofluorescenco.

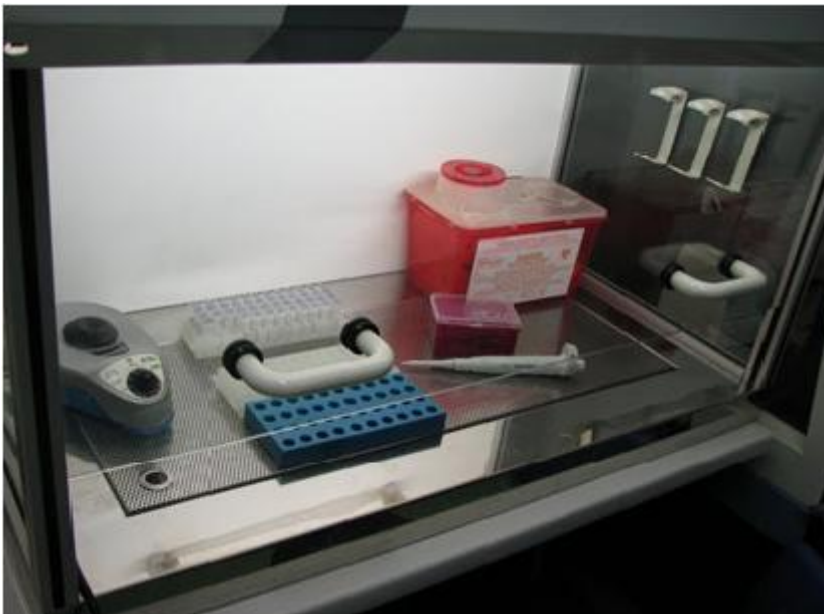
Med 129 vzorci je 63 vzorcev pripadalo osebam moškega spola (48,8 %) in 66 osebam ženskega spola (51,2 %). Največja skupina so bili otroci stari do 1. leta, bilo jih je 75 (58,1 %) 26 otrok do 2. leta starosti (20,1 %), 19 otrok do 3. leta starosti (14,7 %), 2 otroka do 4. leta starosti (1,5 %) in 7 otrok do 5 leta starosti (5,4 %). Imeli smo 82 (63,6 %) vzorcev brisov žrela, 38 vzorcev brisov nazofarinksa (29,5 %) in 9 vzorcev brisov nosu (7 %).

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

- mešalo vorteks
- centrifuga 5412 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- 2 ml epruvice
- stojalo za epruvice
- epruvice ependorf
- ploščica za izvedbo PCR
- pipete v merilnem območju med 2-20 µL, 10-100 µL in 50-200 µL (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- nastavki za pipete

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa,
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

- staničevina
- zaščitne rokavice
- komora za varno izvedbo dela
- natrijev hipoklorit
- StepOne aparaturna za izvedbo Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA)
- MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Švica)
- Hitri test (NOWRSV test kit, Binax, Scarborough, Maine, ZDA)



Slika 3: Biološka varnostna komora za pripravo vzorcev na analizo PCR.

3.3 REAGENTI ZA IZOLACIJO RNA

- aparatura MagNA Pure Compact in Nucleic Acid isolation KIT- diagnostični komplet I (Roche, Basel, Švica)
- 32 kartuš, ki vsebujejo reagente
- 32 setov, ki vsebujejo en mali nastavek in dva velika nastavka za pipetiranje
- litični pufer in proteinaza K
- 2 x 35 epruвет za vzorce (2mL)
- 35 elucijskih epruвет (2mL)
- 35 pokrovčkov

Komponente shranjujemo pri temperaturi +15 do 25°C, do roka označenega na embalaži.



Slika 4: Kartuša, ki se uporablja za izolacijo nukleinskih kislin



Slika 5: Nastavki za pipetiranje

3.4 REAGENTI ZA REAKCIJO RT-PCR

Uporabili smo SuperScript™ III Platinum® Step one Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), komplet vsebuje:

- SuperScript III RT/Platinum TaqMix
- dve reakcijski zmesi: pufer z 0,4mM vsakega dNTP in 6nM MgSO₄
- 50mM magnezijevega sulfata
- Barvilo ROX, za izravnavo začetne fluorescence

4. METODE

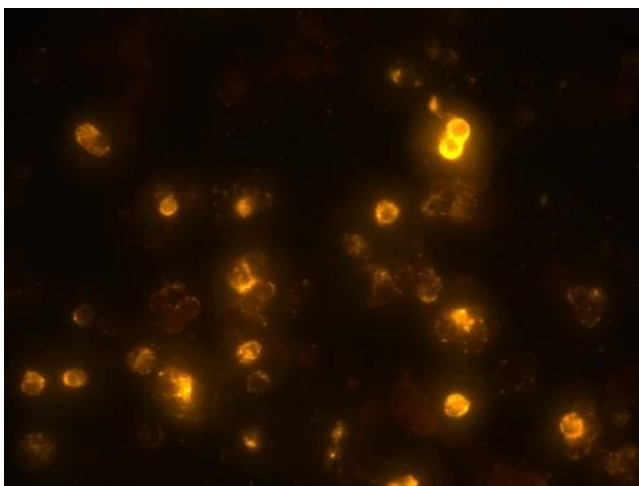
4.1 METODA DIREKTNE IMUNOFLUORESCENCE

Direktna imunofluorescenca je metoda, ki se uporablja za določevanje prisotnosti respiratornih virusov, med njimi je tudi virus RSV. Metoda je natančna, zanesljiva, hitra in rameroma poceni. Metodo bomo le omenili, saj smo njene rezultate uporabili le za primerjavo rezultatov.

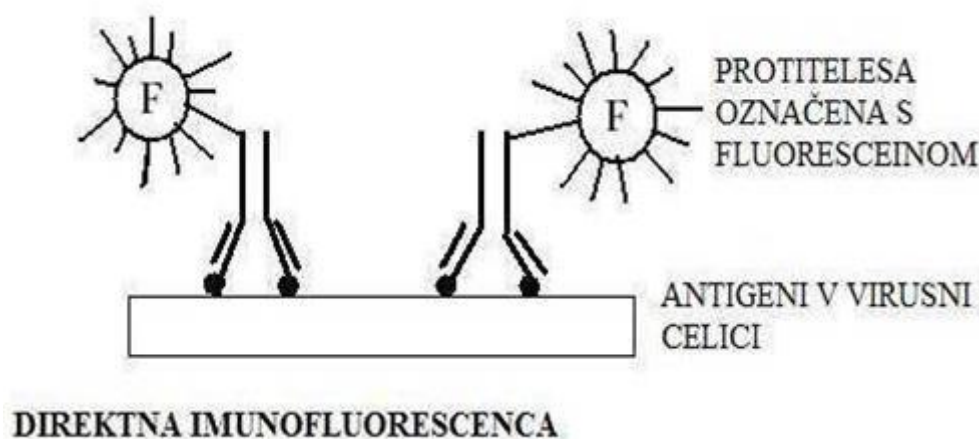
Direktna imunofluorescenca je metoda pri kateri se uporabljajo označena specifična monoklonska protitelesa s fluorokromom za odkrivanje antigenov. Protitelesa, ki so označena z molekulami fluorokromov, intenzivno fluorescirajo. Barva fluorescentne svetlobe je odvisna od barvila, ki ga uporabimo. Najpogosteje se uporabljata barvili:

- fluoresceinov izotiacinat, ki oddaja zelenkasto barvo
- rodaminov izotiacinat, ki oddaja rdečkasto barvo.

Pri direktni imunofluorescenci se protitelo označeno z fluorokromom direktno veže na antigen (14). Preparat opazujemo z mikroskopom z UV žarki predpisane svetlobe, kjer fluorokrom oddaja svetlobo (8).



Slika 6: Prikaz primera detekcije antigenov virusa RSV z metodo direktne imunofluorescence



Slika 7: Shematski prikaz metode DIF

4.2 HITRI IMUNOKROMATOGRFSKI TEST

Navodila za uporabo, so bila priložena diagnostičnemu kompletu, ki smo ga uporabili. Za ugotavljanje natančnosti hitrega testa smo uporabili hitri test NowRSV antigen test diagnostični komplet, ki ga izdeluje podjetje Binax iz Združenih držav Amerike. Uporabili smo diagnostični komplet, ki vsebuje 20 testov ali 50 testov.

Binax NOW RSV test je hitri imunokromatografski test za kvalitativno določanje respiratornega sincicijskega virusa. Antigeni virusa, ki ga dokazujemo se nahaja v nosnem izpirku in v nazofarinksu bolnika. Test se uporablja za *in vitro* diagnostiko okužb z virusom RSV. Hitra identifikacija in diagnoza okužbe z virusom RSV je postala zelo pomembna predvsem zaradi pravilne odločitve glede namestitve bolnika. Zaradi pogostih hospitalnih prenosov okužbe je bistveno, da otroke z okužbo RSV osamimo. Hitri testi bi tudi lahko vplivali na zmanjšanje zasedenosti bolnišnic, zmanjšali uporabo zdravil in zmanjšali stroške bolnišnične oskrbe.

Binax NOW RSV test je imunokromatografski membranski test, ki se uporablja za dokazovanje beljakovinskega antigena virusa RSV v nosnem izpirku ali v brisu nazofarinksa. Protitelesa anti-RSV so adsorbirana na nitrocelulozno membrano in predstavljajo prvo črto na hitrem testu. Antigeni kontrole so adsorbirani na isto membrano in predstavljajo drugo črto. Anti-RSV in antigeni kontrole so konjugirani na delce, ki se

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

obarvajo in so vezani na inertno vlaknasto podlago. To tvori testni trak, ki je na desni strani prepognjenega kartona v obliki knjige, vse skupaj predstavlja hitri test.

Brisi vzorcev (kontrolne in brisi pacientov), morajo biti ustrezno pripravljene. Vzorec mora biti odstranjen s konice brisa, ki smo ga uporabili za odvzem z ustrezno raztopino. V primeru, da je vzorec namenjen testiranju nosni izpirek, predhodna priprava vzorca ni potrebna.

Za izvedbo testa so potrebni naslednji koraki:

- priprava vzorca
- vzorec, ki ga testiramo, dodamo na belo vrhnjo ploskev testnega trakca
- testno napravo zapremo.

Vzorčna črta je rezultat imobilizacije kompleksa antigen-konjugat s protitelesi usmerjenimi proti antigenom virusa RSV. Kontrolna črta je modra, v primeru, da test ni bil uporabljen.

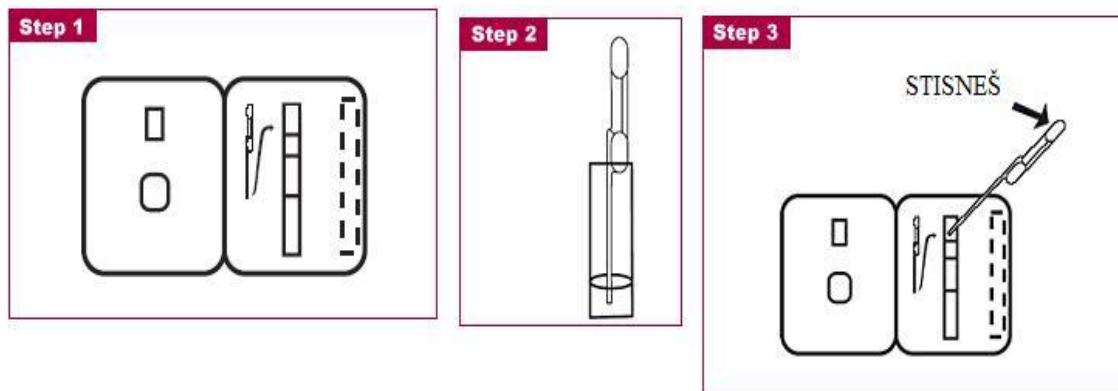
Ko pa se protitelesa ujamejo na kontrolno črto, se ta obarva vijolično. Rezultat interpretiramo vizualno na podlagi prisotnosti ali odsotnosti obarvane nežno vijolične črte.

Pozitivni rezultat, ki ga odčitamo po 15 minutah, vključuje detekcijo obeh črt, vzorčne in kontrolne.

Negativni rezultat, ki ga odčitamo po 15 minutah, se pokaže tako, da se obarva le kontrolna črta, kar pomeni, da antigen RSV v vzorcu ni bil prisoten. Če se kontrolna črta ne obarva in ostane modre barve, pomeni, da test ni bil ustrezen, ne glede na to ali se vzorčna črta obarva ali ne (15).



Slika 8: Hitri test, Binax NOW RSV



Slika 9: Shema, ki prikazuje nanos vzorca

4.3 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN

Za osamitev nukleinskih kislin smo uporabili biorobot MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Švica) in diagnostični komplet MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation (Roche, Basel, Švica).

Osamitev nukleinskih kislin poteka z magnetnimi delci. Skupaj z ustreznim sistemom pufrov, ki omogočajo hitro in učinkovito čiščenje neposredno iz celic in tako dobimo ustrezno izolirano nukleinsko kislino (7). Izolacijo lahko izvedemo iz krvi, krvnih celic, tkiva ali gojenih celic. V prvem delu postopka, biorobot doda encim proteinazo K in pufer za razgradnjo proteinov in nukleaze. Nukleinske kisline se imobilizirajo na površino steklenih magnetnih delcev (MGP). Nevezane snovi se odstranijo z večkratnim spiranjem. Nukleinska kislina se po osamitvi eluira iz steklenih magnetnih delcev (16).

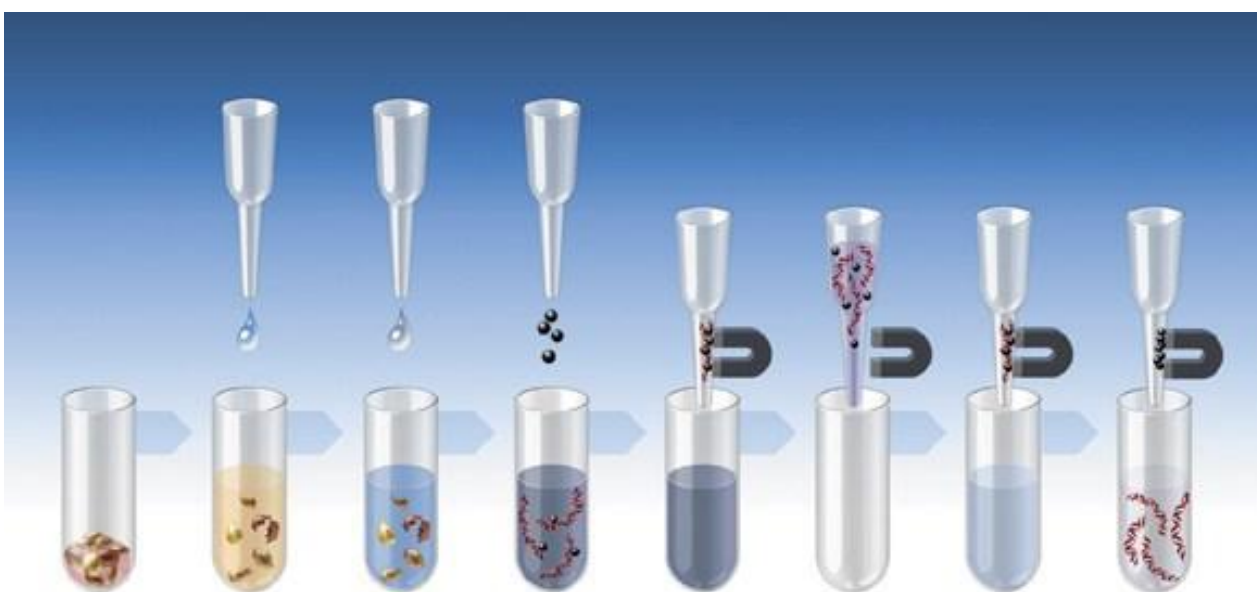
Pred začetkom izvedbe smo vzorce ogreli na sobno temperaturo in jih premešali v vorteksnem mešalu. Odpipetirali smo 200 μ L vzorca in dali v epruvetko (1,5 mL). V aparaturo smo vstavili nastavke za pipetiranje, stojalo z elucijskimi epruvetkami in kartuše. Kartuše je potrebno močno pretresti, da se magnetni delci homogenizirajo. Nastavimo ustrezen protokol, v našem primeru je bil to »DNA-Blood_100_400«, izberemo ustrezen volumen vzorca, 200 μ L in ustrezen volumen elucijske raztopine, 100 μ L.

Osamljeno nukleinsko kislino shranjujemo pri temperaturi -20 °C.

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa,
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo



Slika 10: Aparatura MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Švica)

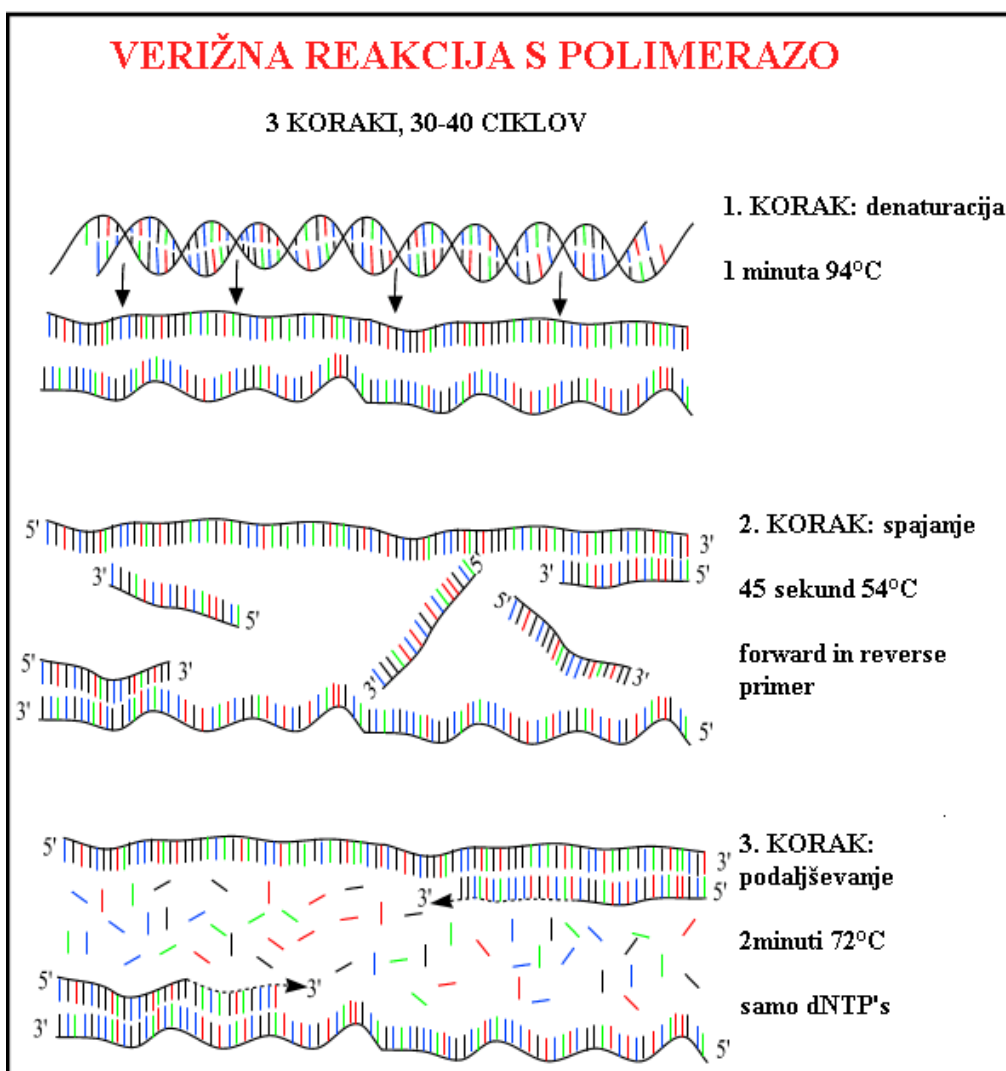


Slika 11: Shematski prikaz osamitve nukleinskih kislin

4.4 DETEKCIJA RESPIRATORNO SINCICIJSKEGA VIRUSA V REALNEM ČASU Z RT-PCR

4.4.1 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO, RT-PCR V REALNEM ČASU

Verižno reakcijo s polimerazo je odkril Kary B. Mullis leta 1983 in za vedno spremenil molekularno biologijo. PCR je danes standardna metoda, ki se uporablja na zelo širokem znanstvenem področju (17). Reakcija PCR temelji na pomnoževanju določenega dela nukleinske kisline s pomočjo polimeraze Taq (termostabilna polimeraza). Taq polimeraza je pridobljena iz termostabilne bakterije *Thermus aquaticus*. (17, 18)



Slika 12: shema prikazuje splošen potek verižne reakcije s polimerazo

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Z metodo PCR lahko pomnožujemo DNA, če želimo pomnoževati RNA je predhodno potrebna inkubacija z obratno transkriptazo, ki molekulo RNA prepíše v cDNA, ki je komplementarna RNA molekuli. Da dobimo ustrezno število molekul DNA je potrebno reakcijo izvesti v velikem številu cikličnih ponovitev - 30 do 40. Vsaka ponovitev je sestavljena iz treh korakov. V prvem koraku poteka denaturacija in ločitev molekule DNA nad 90°C. V drugem koraku, pri temperaturi 50-60°C se začetni oligonukleotidi prilegajo ločenemu delu. V tretjem koraku poteka podaljševanje verige, pri temperaturi 70-78°C.

Metoda PCR v realnem času je hitra, občuljiva in ponovljiva, pri tem je možnost kontaminacije minimalna, saj detekcija poteka hkrati s pomnoževanjem, po končani reakciji pa se zaprt sistem odda v uničenje (19).



Slika 13: Step one aparatura za izvedbo PCR v realnem času.

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Podatke, ki smo jih potrebovali za izvedbo PCR reakcije smo povzeli po raziskovalcih iz Univerze Washington iz Seattla v Združenih državah Amerike (20).

Za uporabo metode RT-PCR v realnem času smo se odločili, ker ima v optimalnih pogojih med vsemi metodami najvišjo občutljivost in specifičnost. Dodatna prednost metode je ta, da nam ob kvalitativnem rezultatu omogoča tudi vpogled v količino virusne RNA v preiskovanem vzorcu. Reakcijo smo izvedli z aparaturo StepOne za izvedbo verižne reakcije s polimerazo - Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA) in SuperScript™ III Platinum® Step one Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

Začetni oligonukleotidi in sonde, ki se uporabljajo pri detekciji RSV z metodo RT-PCR, so deli nukleotidnih zaporedij RSV, ki smo jih preverili v baze podatkov NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, ZDA). Trije začetni oligonukleotidi in sonde so oblikovani tako, da individualno pomnožijo 80 in 81 baznih parov fragmenta RNA RSV virusa tipa A ali tipa B. Sonda za detekcijo tipa A virusa RSV je na 5' koncu označena z barvilom 6FAM, na 3' koncu pa z nefluorescentnim označevalcem (MGBNFQ). Reakciji za pomnoževanje genskih zaporedij virusa RSV je dodan še drugi začetni oligonukleotid in sonda označena z VIC-fluorescentnim barvilom, ki je specifična za genotip B virusa RSV.

Specifična analiza tipa RSV vsebuje set začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo polimerazni RSV gen v območju 94 bp obeh tipov virusa. Za tip A je značilna sonda, ki je označena na 5'koncu z 6FAM. Za RSV tip B je značilna sonda, ki ima 5' konec označen z barvilom VIC. Na 3'koncu sta obe sondi označeni z nefluorescentnim barvilom oziroma dušilcem fluorescence MGBNFQ.

Začetni oligonukleotid

- vodilni oligonukleotidni začetnik
(RSV-F): AAT ACA GCC AAA TCT AAC CAA CTT TAC A
- povratni oligonukleotidni začetnik
(RSV-R): GCC AAG GAA GCA TGC AAT AAA

sonde

- RSV-A-P: 6FAM-TGC TAT TGT GCA CTA AAG-MGBNFQ
- RSV-B-P: VIC-CAC TAT TCC TTA CTA AAG ATG TC-MGBNFQ

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Kontrole

Kontrole smo uporabili, da smo preverili naš postopek dela.

Za pozitivno kontrolo smo uporabili virusno RNA virusa RSV osamljenega iz celične kulture, ki smo jo razredčili v bidestilirani vodi v razmerju 1:1000.

Za negativno kontrolo smo uporabili bidestilirano vodo (Promega, ZDA), ki je primerna za delo v molekularni biologiji.

Reakcijska mešanica, ki smo jo uporabili je sestavljena iz:

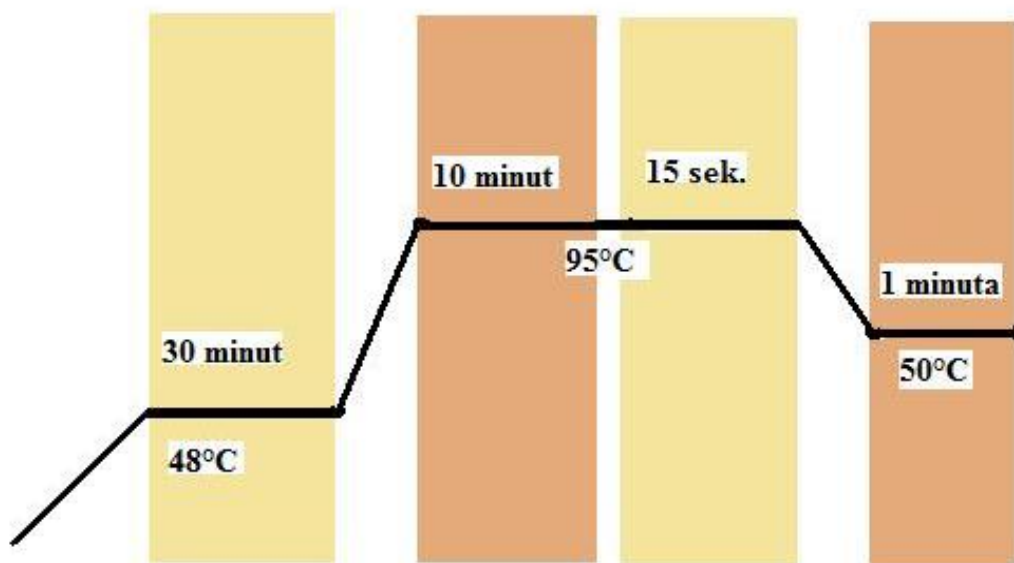
- Mešanice reverzne transkriptaze in polimeraze TaqDNA
- Začetnih oligonukleotidov RSV-A in RSV-B
- Sond RSV-A-P in RSV-B-P
- MgSO₄ koncentracije 50nM
- Pufra
- ROX barvilo, ki se uporablja za izravnavo začetne fluorescence
- Bidestilirana voda

Reakcija poteka v treh korakih.

1. korak: traja 30 minut pri 48°C; poteka reverzni prepis v enem koraku
2. korak: traja 10 minut pri 95°C; aktivira se polimeraza
3. korak poteka ciklično: ima dve stopnji, ki se izmenjata 50 -krat. Prva stopnja poteka najprej pri 95 °C in traja 15 sekund, kjer poteka denaturacija dvovertične DNA. Druga stopnja poteka 1 minuto pri 60 °C, gre za hkratno pripenjanje in podaljševanje začetnih oligonukleotidov (20).

Spremljanje reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da določimo količino pridelka PCR, ko je reakcija v eksponentni fazi. Inštrument na osnovi izmerjenih podatkov izriše krivuljo, ki predstavlja odvisnost intenzitete fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje določi linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato se določi cikel za vsak vzorec, kjer je bil ta prag presežen. Točka, kjer je ta prag presežen, se imenuje »crossing point« (Ct). Vrednost Ct predstavlja predhodno točko zaporednega števila cikla, katerega fluorescenca barvila prvič preseže izračunano stopnjo ozadja. Vrednost Ct je obratno sorazmerna z začetnim številom kopij tarčne DNA v vzorcu. Primerjava vrednosti Ct

standardov z znanim številom kopij tarčne DNA lahko določimo število kopij tarčne DNA v vzorcu. (21)



Slika 14: Shema temperaturnega profila ciklov reakcije PCR

5. REZULTATI

5.1 VZORCI

Prisotnost virusa RSV smo dokazovali v 129 vzorcih otrok starih do 5 let. Vzorci, ki smo jih testirali so bili bris nosu (7%), bris nazofarinksa (29,5%) in bris žrela (63,3%). Med preiskovanci je bilo 63 oseb moškega spola (48,8%) in 66 oseb ženskega spola (51,2%). Največ preiskovancev je bilo starih do enega leta (60,5%).

Tabel I: preiskovani vzorci razporejeni glede na vzorec in starost pacientov

| Vzorec | Starost | | | | | Skupaj |
|-------------------|---------|----|----|---|---|--------|
| | ≤1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Bris nazofarinksa | 23 | 12 | 2 | 0 | 1 | 38 |
| Bris nosu | 5 | 1 | 2 | 0 | 1 | 9 |
| Bris žrela | 47 | 13 | 15 | 2 | 5 | 82 |
| Skupaj | 75 | 26 | 19 | 2 | 7 | 129 |

5.2 REZULTATI METODE DIREKTNE IMUNOFLUORESCENCE

Rezultate metode DIF smo zgolj uporabili za primerjavo rezultatov z metodo PCR in s hitrimi testi. Metoda DIF je bila na vzorcih izvedena v okviru rutinskega diagnostičnega testiranja na prisotnost antigenov virusa RSV in je v okviru diplomske naloge nismo izvajali ali ponavljali. Z metodo DIF smo v rutinski preiskavi kot pozitivne opredelil 42 vzorcev oziroma 32,5 % vseh testiranih vzorcev.

Preglednica II prikazuje rezultate metode DIF glede na starost preiskovancev.

Tabela II: preiskovalni vzorci so razporejeni glede na starost preiskovalcev in rezultate testiranj z DIF

| DIF rezultat | Starost | | | | | Skupaj |
|--------------|---------|----|----|---|---|--------|
| | ≤ 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Negativni | 49 | 19 | 12 | 1 | 6 | 87 |
| Pozitivni | 26 | 7 | 7 | 1 | 1 | 42 |
| Skupaj | 75 | 26 | 19 | 2 | 7 | 129 |

5.3 REZULTATI TESTIRANJA S HITRIM TESTOM

Vse vzorce smo testirali s hitrim imunokromatografskim testom BinaxNow. Kot pozitivne smo opredili 20 od 129 pregledanih vzorcev kar predstavlja 15,5 % od vseh pregledanih vzorcev. Rezultate testiranja prikazujemo v preglednici II.

Tabela III: preiskovalni vzorci razporejeni glede na rezultate testiranja s hitrim testom glede na starost pacientov

| Hitri test | Starost | | | | | skupaj |
|------------|---------|----|----|---|---|--------|
| | ≤ 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Negativni | 61 | 23 | 18 | 2 | 5 | 109 |
| Pozitivni | 14 | 3 | 1 | 0 | 2 | 20 |
| Skupaj | 75 | 26 | 19 | 2 | 7 | 129 |

5.4 REZULTATI REAKCIJE PCR

Z rezultati PCR smo ugotovili prisotnost virusne RNA v vzorcih 48 pacientov (37,2 %). Od tega je bilo 36 bolnikov okuženih z RSV-A (75,0 % vseh pozitivnih vzorcev) in 12 bolnikov z RSV-B (25,0 % vseh pozitivnih vzorcev).

Preglednica IV prikazuje število okuženih po starosti izraženi v letih. Največ okuženih, 29 je bilo pri starosti do 1 leta (60,4 % vseh okuženih).

Tabela IV: Preiskovani vzorci razporejeni glede na starost preiskovalcev in rezultate testiranj s PCR

| PCR | Starost | | | | | Skupaj |
|-----------|---------|----|----|---|---|--------|
| | ≤1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Negativni | 46 | 18 | 11 | 1 | 5 | 81 |
| Pozitivni | 29 | 8 | 8 | 1 | 2 | 48 |
| Skupaj | 75 | 26 | 19 | 2 | 7 | 129 |

5.5 REZULTATI PRIMERJAV TESTIRANJA S TREMI RAZLIČNIMI METODAMI

Rezultate primerjave testiranja z vsemi tremi metodami smo prikazali grafično (Slika 15). Z vsemi tremi metodami smo uspeli dokazati le 17 vzorcev od skupno 50 pravilno pozitivnih vzorcev kar predstavlja le približno tretjino oziroma 34 % vseh pravilno pozitivnih vzorcev. Največ pozitivnih vzorcev, 48 smo dokazali z metodo PCR. Primerjava rezultatov je pokazala, da je bil en vzorec pozitiven samo z metodo DIF in 8 vzorcev (16 %) samo z metodo PCR. Največjo skupino 22 vzorcev predstavljajo vzorci, ki so bili pozitivni hkrati z metodo DIF in PCR.

Za vsako od uporabljenih metod smo ločeno izračunali občutljivost in specifičnost po navedenih formulah:

$$\text{občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \times 100\%$$

$$\text{specifičnost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100\%$$

Tabela V: preglednica razmerij med posameznimi uporabljenimi termini za izračun občutljivosti in specifičnosti posameznih testov

| | | Pravilni rezultati – zlati standard | |
|----------------------|-----------|-------------------------------------|--------------------|
| | | Pozitivni | Negativni |
| Rezultati testiranja | Pozitivni | Pravilno pozitivni | Lažno pozitivni |
| | Negativni | Lažno negativni | Pravilno negativni |

Občutljivost izraža delež pravilno prepoznanih pozitivnih vzorcev in pomeni, da nam prikazuje odstotek okuženih pacientov, ki so bili pravilno prepoznani s testom.

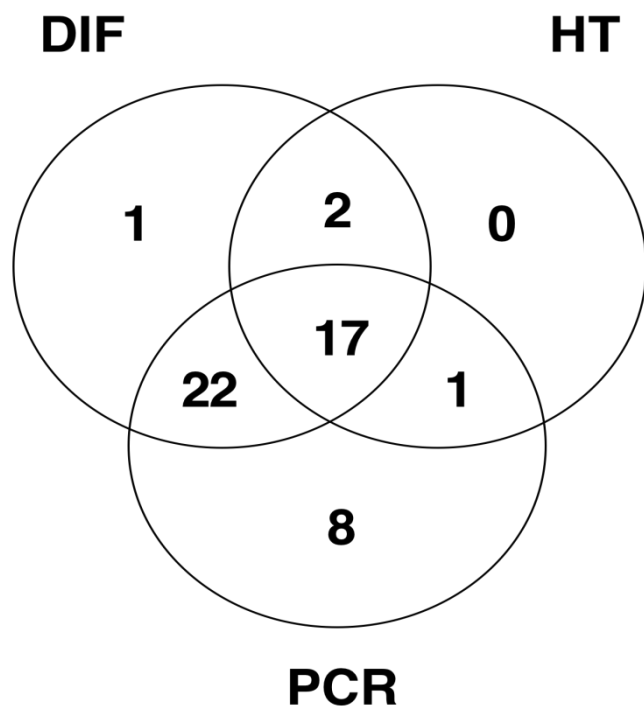
Specifičnost izraža delež pravilno prepoznanih negativnih vzorcev in pomeni, da nam prikazuje odstotek pacientov brez okužbe, ki so bili kot taki pravilno prepoznani s testom.

Za izračun navedenih parametrov smo kot pravilne oz. resnično pozitivne rezultate (nadomestek zlatega standarda) upoštevali tiste, ki so pokazali pozitiven rezultat z reakcijo PCR ali tiste, kjer so se rezultati testiranja ujemali vsaj z dvema različnima metodama.

Izračunana **občutljivost** za hitri test je bila 40 %, specifičnost je bila 100 %.

Izračunana **občutljivost** za test DIF je bila 82 %, specifičnost je bila 98,7 %.

Izračunana **občutljivost** za metodo PCR je bila 96 %, specifičnost je bila 100 %.



Slika 15: Grafični prikaz pozitivnih rezultatov testiranja s tremi testi za diagnostiko okužb z RSV. DIF- metoda direktne imunofluorescence, HT- hitri imunskokromatografski test, PCR- verižna reakcija s polimerazo.

Številke v zunanjem obroču predstavljajo vzorce, ki so bili pozitivni samo z eno metodo. Številke v srednjem obroču, predstavljajo vzorce, ki so bili pozitivni z dvema metodama. Število v sredini predstavlja število pozitivnih vzorce z tremi metodami.

5.6. REZULTATI VREDNOSTI Ct

Izračunali smo povprečne vrednosti Ct in jih primerjali med seboj.

Vrednost Ct pri pozitivnem PCR in pozitivnem hitrem testu je znašala 27,12.

Vrednost Ct pri pozitivnem PCR in negativnem hitrem testu je znašala 32,00.

Vrednost CT pri pozitivnem PCR in negativnem hitrem testu je znašala 27,40.

Vrednost Ct pri pozitivnem PCR in negativnem DIF je znašala 33,14.

Vrednost vseh pozitivnih PCR je znašala 30,17.

Določili smo tudi povprečno vrednost CT pri moškem (30,7) in ženskem(29,69) spolu.

6. RAZPRAVA

Dokazovanje virusa RSV v vzorcih dihal, najpogosteje poteka z dokazovanjem antigenov virusa z monoklonskimi protitelesi in sicer z metodo, ki temelji na principu direktne imunofluorescence. Bolj sodobna in zaradi tehničnih lastnosti metode je bolj občutljiva metoda PCR, kjer lahko poleg določitve prisotnosti nukleinske kisline virusa RSV, s specifičnimi sondami določimo tudi genotip virusa in ocenimo količino virusne RNA v tarčnem vzorcu.

V diplomski nalogi smo hoteli ugotoviti primernost uporabe hitrih imunskokromatografskih testov za dokaz okužb z virusom RSV v primerjavi z metodo direktne imunofluorescence in metodo PCR. Hitri testi so enostavni za uporabo, lahko jih izvaja razmeroma neizurjeno osebje, rezultat je na voljo že v največ 30 minutah in se lahko izvajajo v urgentni ambulanti, kjer je bolnik prvič pregledan. Z nobeno drugo metodo (DIF, PCR) trenutno še ne moremo doseči hitrosti izvedbe hitrih testov. Hitrost in mesto izvedene preiskave lahko vplivata na pomembne odločitve glede začetka bolnikovega zdravljenja, izvajanja drugih diagnostičnih preiskav in njegove namestitve v bolnišnici (22).

Glavna pomanjkljivost hitrih testov je običajno v njihovi nizki občutljivosti, včasih tudi nekoliko nižji specifičnosti v primerjavi s standardnimi testi kot sta DIF in PCR. Na rezultate hitrega testa za dokaz virusnih antigenov in deloma tudi testa DIF močno vpliva količina virusnih delcev v odvzetih kužninah. Metoda DIF je še posebej občutljiva tudi na zmanjšano količino celic v kužnini, ki so ključnega pomena za dokaz virusnih okužb z uporabo monoklonskih protiteles. Dokaz virusnih antigenov z metodo DIF namreč poteka z mikroskopiranjem preparatov suspenzij celic z mikroskopom z UV svetlobo. Količina celic v odvzetem vzorcu pa je močno odvisna od kvalitete odvzema vzorca. Še posebej je to izraženo pri odvzemu nazofaringealnega brisa ali aspirata, ki predstavljata najpomembnejši kužnini v diagnostiki virusnih okužb dihal. Znano je tudi, da količinsko največ virusov izločajo otroci. Na količino virusnih delcev v kužnini močno vpliva tudi čas od začetka bolezni do odvzema kužnin. Največja količina virusa RSV v dihalih je prve tri dni po začetku simptomov (22). Pomembno je tudi mesto in način odvzema kužnine, saj so raziskovalci dokazali, da je najboljša kužnina aspirat nazofarinksa, sledi mu bris nazofarinksa odvzet s krtačkastim brisom (angl. *flocked swab*) (23, 24). V nekaterih

novejših objavah pa so drugi raziskovalci ugotovili, da glede na mesto odvzema pri okužbi z virusom RSV ni bistvenih razlik pri uspešnosti dokazovanja virusa glede na mesto odvzema kužnine. Podariti je potrebno, da so raziskovalci do takšnih zaključkov prišli, ko so za dokazovanje virusa RSV uporabljali metodo PCR (22).

Z analizo tipa vzorcev smo ugotovili, da je bilo med 129 vzorci odvzetih največ brisov žrela (82), sledili so brisi nazofarinksa (38) in le redko brisi nosu (9).

Večina vzorcev (75) je bila odvzetih v starostni skupini 1, ki predstavlja otroke v starosti od rojstva do prvega leta starosti. Podatki so skladni z epidemiologijo okužb z virusom RSV, saj se večina otrok v populaciji z virusom sreča že v prvem letu življenja. Okužbe z virusom RSV potekajo s hujšo klinično sliko kar dodatno pojasnjuje prevlado te starostne skupine v naših vzorcih (12). Presenetil nas je delež brisov žrela, ki so predstavljali kar 64 % vseh odvzetih vzorcev. Glede na podatke objavljene v literaturi bi bilo smiselno pošiljateljke kliničnih vzorcev obvestiti o novih rezultatih raziskav, ki so pokazale, da je najboljša kužnina za dokaz respiratornih virusov aspirat ali bris nazofarinksa (23).

Od 129 pregledanih vzorcev s hitrim testom, otrok starih do 5 let je bilo pozitivnih 20 vzorcev, kar predstavlja 16 % oseb v pregledani populaciji. Isti vzorci so bili v laboratoriju predhodno že rutinsko testirani z metodo DIF. Ugotovili so, da je bilo pozitivnih 42 vzorcev oziroma 32,5% pregledanih vzorcev. Iz vseh preiskovanih vzorcev smo osamili nukleinsko kislino in pomnožili tarčni odsek virusa RSV in ugotovili, da je bila virusna RNA prisotna v 48 vzorcih oziroma v 37 % pregledanih vzorcev.

Rezultati posamičnih testov nam kažejo na to, da občutljivost testov za dokaz okužbe z RSV narašča v smeri od hitrih testov preko metode DIF do PCR. Razlika v občutljivosti med hitrim testom in metodo DIF je občutno višja kot je razlika med metodo DIF in PCR. To pomeni, da je hitri test razmeroma slabo občutljiv za dokazovanje okužb z RSV, saj je pravilno opredelil le 20 vzorcev od 50 pravilno pozitivnih, oziroma ima 40 % občutljivost pri testiranju naše populacije pacientov.

Najboljšo občutljivost je po pričakovanju dosegla metoda PCR z 96 %. Zato nas je presenetila primerjava rezultatov, kjer pri dveh vzorcih, ki sta bila potrjena z dvema metodama nismo mogli pomnožiti nukleinske kisline virusa RSV. Vzrok za dva lažno negativna rezultata z metodo PCR bi lahko pojasnili z inhibicijo reakcije PCR, napako v izolaciji nukleinskih kislin ali v degradaciji tarčne RNA. Za oba vzorca smo ponovili reakcijo PCR in dodatno ponovno osamili nukleinske kisline in izvedli ponovni PCR. Tudi

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

po ponovitvah obeh postopkov so rezultati ostali enaki zato sta najverjetnejša vzroka za negativni rezultat degradacija RNA in/ali prisotnost inhibitorjev polimeraze v osnovnih vzorcih. Minimalna možnost je tudi, da bi bil pri dveh vzorcih tarčni del genoma toliko spremenjen, da uporabljeni oligonukleotidni začetniki ne bi pomnožili tarčnega genomskega odseka. Ta možnost je zelo težko dokazljiva in jo upoštevamo zgolj kot teoretično možnost.

Specifičnost vseh treh testov je zelo visoka. Edini test, kjer smo dokazali en lažno pozitiven rezultat je bila metoda DIF. Glede na to, da se pri metodi DIF rezultat opredeljuje z mikroskopiranjem, je vedno mogoča vsaj minimalna subjektivnost pri opredelitvi za pozitiven rezultat. Zato izvajanje metode DIF zahteva osebje z večletnimi izkušnjami pri interpretaciji in mikroskopiranju.

Z uporabo dveh različnih detekcijskih sond oziroma lovck smo z metodo PCR lahko določili tudi genotipe virusa RSV, ki so povzročili okužbe. Genotip A je bil zastopan v večini primerov 75 %, genotip B pa v 25 %.

Naši rezultati so primerljivi s podobnimi opisi v tuji literaturi, vendar je občutljivost hitrega testa med nižjimi v primerjavi z opisi podobnih študij v tujini (22, 25). Razloge za tako nizko občutljivost bi lahko iskali v neoptimalni kužnini saj je bila večina naših vzorcev brisov žrela, ki jih proizvajalec hitrega testa prvenstveno ne priporoča za diagnostiko okužb z virusom RSV. Druga odstopanja od priporočil proizvajalca so tudi ta, da so bili vzorci predhodno že testirani in zmrznjeni kar lahko vpliva na količino in kvaliteto ohranjenih virusnih antigenov. Pri testiranju z metodo DIF se namreč za izvedbo porabi velik del celic, ki so prisotne v odvzetem brisu in lahko sklepamo da je količina, ki ostane na voljo za hitri test zmanjšana za več kot polovico. Morda je na naše rezultate vplival tudi izbor vzorcev saj smo imeli v naši pregledovani populaciji precejšnje število otrok starih več kot eno leto za katere vemo, da v izločkih dihal izločajo manjšo količino virusa kot otroci v prvih 12 mesecih življenja (12).

7. SKLEPI

- V sezoni okužb z virusom RSV lahko okužbo dokažemo s hitrim imunskokromatografskim testom, metodo direktne imunofluorescence in z verižno reakcijo s polimerazo.
- Z metodo PCR smo med testiranimi vzorci dokazali, da je bilo z virusom RSV okuženih 48 pacientov oziroma 37,2 % vseh preiskovanih.
- V opazovanem obdobju je večino okužb povzročil RSV-A 36 bolnikov oz. 75,0 % preiskovanih in redkeje RSV-B - 12 bolnikov oziroma 25,0 % preiskovanih.
- Občutljivost metod za dokazovanje narašča z uporabo sodobnejših metod.
- Rezultatov 3 pozitivnih vzorcev na imunskokromatografskem testu in z metodo direktne imunofluorescence nismo mogli potrditi z verižno reakcijo s polimerazo.
- Hitri imunsko-kromatografski test se je v naši raziskavi izkazal kot slabo občutljiva metoda, zato menimo, da je pogojno primeren za uporabo le v ustanovah, kjer vse negativne rezultate vzorcev iz hitrega testiranja dodatno preverijo z metodo PCR.
- Najbolj občutljiva in specifična metoda za dokazovanje virusa RSV je reakcija PCR v realnem času.

8. LITERATURA

- 1) Kuypers J, Wright N, Morrow N: Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimen from children. *Journal of Clinical Virology* 2004; 31: 123-129.
- 2) Pokorn M, Čižman M, Primožič J, Babnik J, Kopriva S, Roškar Z: Strokovna izhodišča za uporabo specifičnih monoklonskih protiteles (Palivizumab) za preprečevanje okužb z respiratornim sincicijskim virusom (RSV) v Sloveniji, *Zdravstveni vestnik* 2002; 71:645-6.
- 3) Blach CP: Systematic Review of the Biology and Medical Management of Respiratory Syncytial Virus Infection, *Respiratory Care* 2003, 48: 209-31.
- 4) Woensel JBM, Van Aalderen WMC, Kimpen JLL: Viral lower respiratory tract infections in infants and young children. *British medical journal* 2003; 327: 36–40.
- 5) Brooks GF, Carroll KC, Beets JS, Morse SA; Jawetz, Melnick and Adelberg's *Medical Microbiology*, McGraw-Hill Medical, 2007, 334-335.
- 6) Krilov LR, MD; Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection, Winthrop University Hospital, julij 2009, <http://emedicine.medscape.com/article/971488-overview> 17.1.2010.
- 7) Paulssen RH, Olsen L, Sogn TC: MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit: Isolation of High-Quality Total RNA from a Broad Range of Sample Material, *Biochemica* 2006; 2: 14-16.
- 8) Dragaš AZ, *Mikrobiologija z epidemiologijo*, DZS, Ljubljana, 1998, 95.
- 9) Brearey SP, Smyth RL: *Vaccines Against Human Respiratory Syncytial Virus*, Oxford, Velika Britanija, 2007; 141-142.
- 10) 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.
- 11) Knipe DM, Howley DM: *Fields Virology*, Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, 1450.
- 12) Melero JA: *Molecular biology of human respiratory syncytial virus*, Oxford, Velika Britanija, 2007, 1.

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

- 13) Polak MJ, Respiratory Syncytial Virus (RSV): The RSV Virus; Morgantown, USA, http://www.medscape.com/viewarticle/472399_3 (17.1.2010).
- 14) Vozelj M: Imunologija – enciklopedijski priročnik, DZS, Ljubljana, 1996, 136.
- 15) BINAX, Inc.: Instructions for use. NOW RSV Test Kit, Maine, USA.
- 16) Paulssen RH, Olsen L, Sogn TC: MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit: Isolation of High-Quality Total RNA from a Broad Range of Sample Material, *Biochemica* 2006;2: 14-16.
- 17) <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtim epcr.htm> (17.1.2010).
- 18) Koren S, Avšič-Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M: Splošna Medicinska Virologija, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 115-17.
- 19) Mackay M: Real-time PCR in the microbiology laboratory, *Clinical Microbiol Infect*, 2004, 10: 190-212.
- 20) Kuypers J, Wright N, Morrow R: Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimen from children. *Journal of Clinical Virology* 2004; 31: 123-129.
- 21) Arko B.: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmaceutski vestnik* 2004; 55:215-20
- 22) Selvarangan R, Abel D, Hamilton M. Comparison of BD Directigen EZ RSV and Binax NOW RSV tests for rapid detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates in a pediatric population. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2008; 62: 157-161.
- 23) Lieberman D, Lieberman D, Shimoni A, Keren-Naus A, Steinberg R, Shemer-Avni Y: Identification of Respiratory Viruses in Adults: Nasopharyngeal versus Oropharyngeal Sampling. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 3439–3443.
- 24) Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, Ghneim R, Zoughbi M, Turkuman S, Rishmawi N, Issa AE, Siriani I, Dauodi R, Kattan R, Hindiyeh MY: Comparison between Pernasal Flocked Swabs and Nasopharyngeal Aspirates for Detection of Common Respiratory Viruses in Samples from Children. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 2414-2417.
- 25) Lipson SM, Popiolek D, Hu QZ, Falk LH, Bornfreund M, Krilov LR: Efficacy of Directigen RSV testing in patient management following admission from a paediatric emergency department. *Journal of Hospital Infection* 1999; 41: 323-9.

9. LITERATURA SLIK

1. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Respiratory_Syncytial_Virus_%28RSV%29_EM_PHIL_2175_lores.jpg (17.1.2010)
2. http://www.medscape.com/viewarticle/472399_3 (17.1.2010)
3. Fotografija
4. <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/852/The-New-MagNA-Pure-Compact-System.html> (17.1.2010)
5. <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/852/The-New-MagNA-Pure-Compact-System.html> (17.1.2010)
6. http://www.microgenbioproducts.com/product_news.htm (17.1.2010)
7. Fotografija
8. <http://www.remelinc.com/Clinical/Virology/BinaxNOW.aspx> (17.1.2010)
9. http://www.invernessmedicalpd.com/point_of_care/respiratory/binaxnow%C2%AE_rsv.aspx (17.1.2010)
10. Fotografija
11. : https://www.roche-applied-science.com/ProdInfo/en_US/3_8_2_1_1_1.htm (17.1.2010)
12. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (17.1.2010)
13. Fotografija
14. Slika
15. Slika

PRILOGA 1

Priloga A: Seznam naključno izbranih vzorcev, ki smo jih testirali s hitrim imunsko kromatografskim testom, Metodo DIF in metodo RT-PCR.

| Datum sprejema | Spol | Vzorec | Starost | DIF-RSV | Hitri test | PCR | Ct | Tip RSV |
|----------------|------|---------|---------|------------|------------|-----|-------|---------|
| 1.1.2009 | Ž | bris NF | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 1.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 1.1.2009 | Ž | bris N | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 1.1.2009 | M | bris N | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 1.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | POZ | 37,54 | B |
| 1.1.2009 | M | bris N | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 1.1.2009 | M | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 1.1.2009 | Ž | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 1.1.2009 | M | bris Ž | 3 | POZ | NEG | POZ | 35,33 | A |
| 1.1.2009 | M | bris N | 3 | POZ | NEG | POZ | 30,94 | A |
| 1.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 26,1 | A |
| 2.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | M | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | M | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | Ž | bris N | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | M | bris N | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | Ž | bris N | 1 | POZ | POZ | POZ | 27,94 | B |
| 2.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | POZ | POZ | POZ | 28,95 | B |
| 2.1.2009 | Ž | bris N | 5 | NEG | POZ | POZ | 29,41 | B |
| 2.1.2009 | Ž | bris Ž | 5 | POZ | POZ | POZ | 25,32 | B |
| 2.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 24,74 | A |
| 2.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | M | bris Ž | 5 | NEG | NEG | NEG | | |
| 2.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 3.1.2009 | M | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 3.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | POZ | POZ | NEG | | |
| 3.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | POZ | POZ | 27,96 | A |
| 3.1.2009 | Ž | bris Ž | 2 | POZ | POZ | POZ | 24,55 | A |
| 3.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 3.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | POZ | POZ | 27,22 | A |
| 3.1.2009 | Ž | bris NF | 2 | POZ | NEG | POZ | 28,81 | B |
| 3.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 33,76 | A |
| 3.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | NEG | POZ | 32,53 | A |
| 3.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | NEG | NEG | POZ | 35,6 | A |

| Datum sprejema | Spol | Vzorec | Starost | DIF-RSV | Hitri test | PCR | Ct | Tip RSV |
|----------------|------|---------|---------|---------|------------|-----|-------|---------|
| 3.1.2009 | M | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 29,16 | A |
| 3.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 29,94 | B |
| 3.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 3.1.2009 | M | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 4.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | NEG | NEG | | |
| 4.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 30,82 | A |
| 4.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 32,42 | A |
| 4.1.2009 | Ž | bris Ž | 5 | NEG | NEG | NEG | | |
| 4.1.2009 | Ž | bris Ž | 4 | NEG | NEG | NEG | | |
| 4.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 4.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | POZ | 30,38 | A |
| 5.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | NEG | NEG | POZ | 31,26 | A |
| 5.1.2009 | M | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | M | bris NF | 2 | POZ | NEG | POZ | 35,27 | A |
| 5.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | NEG | NEG | POZ | 34,65 | A |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | POZ | NEG | POZ | 31,35 | A |
| 5.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 33,31 | A |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 38,34 | A |
| 5.1.2009 | M | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 5.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | POZ | 32,99 | B |
| 5.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 6.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | POZ | POZ | 26,94 | A |
| 6.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 6.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 6.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | POZ | NEG | POZ | 31,56 | A |
| 6.1.2009 | M | bris NF | 1 | POZ | NEG | POZ | 28,88 | A |
| 6.1.2009 | Ž | bris NF | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 7.1.2009 | M | bris Ž | 5 | POZ | NEG | POZ | 30,89 | B |
| 7.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 7.1.2009 | M | bris NF | 2 | POZ | NEG | POZ | 30,24 | A |
| 7.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 7.1.2009 | M | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 7.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |

| Datum sprejema | Spol | Vzorec | Starost | DIF-RSV | Hitri test | PCR | Ct | Tip RSV |
|----------------|------|---------|---------|------------|------------|-----|-------|---------|
| 7.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 7.1.2009 | M | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | Ž | bris NF | 2 | POZ | NEG | POZ | 26,35 | A |
| 8.1.2009 | M | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | Ž | bris NF | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | M | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | POZ | NEG | | |
| 8.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 30,95 | A |
| 8.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 8.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | M | bris NF | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | Ž | bris Ž | 2 | NEG | NEG | POZ | 39,55 | B |
| 9.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 29,31 | A |
| 9.1.2009 | M | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 26,89 | A |
| 9.1.2009 | Ž | bris NF | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | POZ | NEG | POZ | 32,96 | A |
| 9.1.2009 | Ž | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | M | bris NF | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | Ž | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 9.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 28,58 | B |
| 9.1.2009 | M | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 10.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 10.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 11.1.2009 | M | bris NF | 5 | NEG | NEG | NEG | | |
| 11.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 11.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | NEG | NEG | NEG | | |
| 11.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 29,96 | A |
| 12.1.2009 | M | bris Ž | 5 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 23,32 | A |
| 12.1.2009 | Ž | bris NF | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | M | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 25,95 | B |
| 12.1.2009 | M | bris NF | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | M | bris Ž | 2 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | M | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | Ž | bris Ž | 3 | POZ | POZ | POZ | 26,67 | A |

Bevc, T.: Primerjava treh metod za dokazovanje respiratornega sincicijskega virusa,
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

| Datum sprejema | Spol | Vzorec | Starost | DIF-RSV | Hitri test | PCR | Ct | Tip RSV |
|----------------|------|---------|---------|---------|------------|-----|-------|---------|
| 12.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 12.1.2009 | M | Bris Ž | 3 | NEG | NEG | POZ | 26,94 | A |
| 12.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 13.1.2009 | M | bris NF | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 13.1.2009 | Ž | bris NF | 1 | POZ | POZ | POZ | 23,34 | A |
| 13.1.2009 | Ž | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |
| 13.1.2009 | M | bris Ž | 1 | POZ | NEG | POZ | 31,66 | A |
| 13.1.2009 | Ž | bris N | 3 | POZ | NEG | POZ | 30,85 | A |
| 13.1.2009 | Ž | bris Ž | 5 | NEG | NEG | NEG | | |
| 13.1.2009 | M | bris Ž | 1 | NEG | NEG | NEG | | |

Legenda: bris NF- bris nazofarinksa; bris Ž- bris žrela; bris N-bris nosu; DIF-RSV- rezultati DIF za virus RSV; Ct- prehodna točka zaporednega cikla.