

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KOVAČ

**PRIMERJAVA HITREGA ANTIGENSKEGA TESTA Z METODO
VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČANJE VIRUSA
INFLUENCE A**

**COMPARISON OF RAPID ANTIGENE TEST WITH POLYMERASE
CHAIN REACTION ASSAY FOR DIAGNOSIS OF VIRUS
INFLUENZA A**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, ki je v sklopu Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani pod vodstvom doc. dr. Miroslava Petrovca.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, ki mi je omogočil izvajanje diplomske naloge in me usmerjal med njeno izdelavo. Prav tako se zahvaljujem vsem delavkam v Laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb, ki so mi pomagale pri pisanju diplomske naloge in mi odgovorile na marsikatero vprašanje.

Posebna zahvala gre moji mami, prijateljem in vsem, ki so mi na kakršenkoli način pomagali pri pripravi in izdelavi diplomskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Miroslava Petrovca.

Podpis:

VSEBINA

POVZETEK	6
ABSTRACT	7
SEZNAM OKRAJŠAV	8
1. UVOD	10
1.1 VIRUS INFLUENCE	10
1.2 OPIS METOD IN KUŽNIN	13
1.2.1 Kužnine primerne za diagnostiko influence	13
1.2.2 Hitri imunokromatografski testi	15
1.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času	17
1.2.4 Osamitev nukleinskih kislin	20
1.2.5 Poskus osamitve virusov	21
1.2.6 Imunodetekcija virusnih antigenov	21
1.3 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	23
1.3.1 Občutljivost	23
1.3.2 Specifičnost	23
2. NAMEN DELA	24
3. MATERIALI IN METODE	25
3.1 PRIPRAVA VZORCEV	25
3.2 HITRI TEST TRU FLU	25
3.2.1 Vsebina kompleta	25
3.2.2 Potek testa	26
3.2.3 Vrednotenje rezultatov hitrega testa	26
3.3 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN Z APARATURO MagNA PURE COMPACT	28
3.3.1 Vsebina kompleta (MagNA Pure Compact nucleic acid isolation kit I, Roche, Basel, Švica)	28
3.3.2 Potek osamitve nukleinskih kislin	29
3.4 METODA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO S PREDHODNJIM OBRATNIM PREPISOM V REALNEM ČASU (rRT-PCR)	30
3.4.1 Komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative Kit (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)	30
3.4.2 Potek rRT-PCR metode	31
3.4.3 Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetkov in lovk	31
4. REZULTATI	32
4.1 REZULTATI HITREGA IMUNOKROMATOGRFSKEGA TESTA	32
4.2 REZULTATI RT-PCR METODE V REALNEM ČASU	33
4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV HITREGA IMUNOKROMATOGRFSKEGA TESTA Z REZULTATI RT-PCR METODE V REALNEM ČASU	33
4.4 IZRAČUN OBČUTLJIVOSTI IN SPECIFIČNOSTI	36
5. RAZPRAVA	37
6. SKLEPI	40
7. LITERATURA	41

SEZNAM SLIK

Slika 1: Nastajanje novih sevov influence A.....	1
Slika 2: Odvzem brisa nazofarinksa.....	14
Slika 3: Hitri imunokromatografski test TRU FLU.....	16
Slika 4: Stopnje cikla pri PCR metodi: 1 - denaturacija in razklenitev dvovijačne DNK, 2 - pripnjanje začetnih oligonukleotidov, 3 - podaljševanje verige s polimerazo.....	1
Slika 5: Fluorescenca pri pozitivnem vzorcu na influenco A.....	22
Slika 6: Različna intenziteta obarvanja na testnih trakovih hitrega testa.....	1

SEZNAM PREGLEDNIC

Tabela 1: Prikazuje primerjavo rezultatov med metodama PCR in hitrim testom pri vseh pacientih.	34
Tabela 2: Prikazuje primerjavo rezultatov med metodama RT-PCR in hitrem testu ter njihove odstotke pri otrocih starih do vključno 16 let.	34
Tabela 3: Prikazuje primerjavo rezultatov med metodama RT-PCR in hitrim testom ter njihove odstotke pri odraslih.	35

POVZETEK

Gripa je bolezen, ki jo povzročajo virusi influence. Pri človeku se največkrat pojavlja obolelost za influenco A in B. Leta 2009 je prišlo do izbruha oziroma pandemije, ki jo je povzročil nov virus influence A tipa H1N1. Zaradi te se je povečalo tudi število testiranj bolnikov s sumom na gripo. Z namenom, da bi zdravniki čim hitreje prišli do rezultatov in posledično do ukrepanja pri obolelih, je treba izbrati test, ki ga lahko čim prej izvedemo, hkrati pa morajo biti ti rezultati zanesljivi. Za praktično uporabo na mestu sprejema bolnika bi bila zaželena uporaba imunokromatografskih hitrih testov, ki jih lahko izvaja tudi neizurjeno nelaboratorijsko (zdravniško) osebje.

Namen diplomske naloge je bil primerjati rezultate testiranja na virus influence A s hitrim imunokromatografskim testom in s testom verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-PCR), ki velja za metodo izbora. Hitri imunokromatografski test temelji na principu vezave kompleksov primarnih protiteles in antigenov s sekundarnimi protitelesi. Določiti smo želeli tudi občutljivost in specifičnost hitrega testa v primerjavi z metodo RT-PCR. Želeli smo tudi ugotoviti, ali je hitri test enako uporaben v otroški in odrasli populaciji pacientov.

V zimskem obdobju leta 2009 smo skupno testirali 120 zaporednih pacientov, ki so bili pregledani v urgentni ambulanti Klinike za infektivne bolezni in vročinska stanja, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Polovica bolnikov je pripadala pediatrični populaciji (do 16 leta) polovica je bila odraslih oseb. Med 120 pregledanimi vzorci smo s hitrim testom potrdili okužbo pri 20 preiskovancih (16,7%). Med otroci smo okužbo potrdili v 15 primerih in v petih primerih pri odraslih. Z metodo RT-PCR smo okužbo z influenco A potrdili skupno v 46 vzorcih pacientov (40 %) in sicer pri 26 otrocih in 20 odraslih. Pri hitrem testu je bilo 28 vzorcev lažno negativnih, noben pa ni bil lažno pozitiven. Ugotovili smo, da je bila vrednost cikla presežka primarnega praga fluorescence pri pozitivnih vzorcih otrok nižja kot pri odraslih. Izračunali smo, da je občutljivost hitrega imunokromatografskega testa za vse testirane vzorce 41,7 % in sicer pri otrocih 53,6 % in pri odraslih 25 %.

Na podlagi rezultatov sklepamo, da je uporaba hitrega testa primernejša v populaciji otrok in v primerih, ko lahko negativne rezultate preverimo z ustreznim molekularnim testom.

ABSTRACT

Flu is a disease caused by influenza virus. Humans get ill for influenza A or B. In 2009 there was a pandemic outbreak of influenza A (H1N1). This caused larger number of testing patients with influenza like illness. That doctors can have faster access to results and that they can take some actions, we have to choose a test which can be quickly performed and has a reliable results. In practical use when we accept the patient there would be better to use rapid immunochromatographic assay which can be performed by nonlaboratory (medical) person with lack of skills.

The purpose of the work was to compare results of testing on influenza A from immunochromatographic rapid assay and polymerase chain reaction assay (RT-PCR) which is the method of use. Rapid immunochromatographic assay is based on binding complexes of primary antibodies and antigens with secondary antibodies. We wanted to determine sensitivity and specificity of rapid test in comparison with RT-PCR method. We also wanted to know if the rapid test is equally efficient in children and adults. In winter 2009 we tested 120 serial patients which were accepted in infirmary of clinic for infectious diseases and five states in university clinical center in Ljubljana. Half of patients were children (up to 16 years old) and the other half were adult patients. In 120 tested samples there were 20 patients (16,7%) in which we confirmed the infection with rapid test. In children we confirmed the infection in 15 cases in adults there were 5 cases. With RT-PCR method we determined the infection with influenza A in samples of 46 patients (40%) in which case there were 26 children and 20 adults. In rapid assay there were 28 false negative samples and none false positive. We found out that the threshold cycle values were lower in samples from children than in samples from adults. For all tested samples we calculated the sensitivity of rapid test which was 41,7% in children population it was 53,6% in adults there was 25%.

From the results we can assume that use of rapid test is more appropriate in children population and in cases where we can test negative results with appropriate molecular method.

SEZNAM OKRAJŠAV

BAL – bronhoalveolarni izpirek

BM2 – membranski protein

C – kontrolni vzorec

CPU – citopatski učinki

Ct - cikel presežka primarnega praga fluorescence

DNA – deoksiribonukleinska kislina

dNTP – deoksiribonukleozid-trifosfat

FITC – fluorescein izotiocianat

GC – plinska kromatografija (gas chromatography)

H1N1 – oznaka podtipa nove influence

H - hemaglutinin

HEF – protein, ki nadomesti hemaglutinin in nevraminidazo

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)

LC – tekočinska kromatografija (liquid chromatography)

M1 – matrični protein

M2 – ionski kanal

MF – mobilna faza

MGP – magnetno-stekleni delci (magnetic glass particles)

MgSO₄ – Magnezijev sulfat

N – nevraminidaza

NB – protein

NEP/NS2 – protein za izločanje ribonukleinske kisline iz celice

NP – nukleokapsidna beljakovina, ki veže ribonukleinske molekule

NS1 – interferon antagonistični protein

PA – podenota polimeraze s proteazno aktivnostjo

PB1 – podenota polimeraze 1

PB2 – podenota polimeraze 2

PBS – fosfatni pufer

PCR – verižna reakcija s polimerazo

RNA – ribonukleinska kislina

RT – reverzna transkriptaza

RT-PCR – verižna reakcija s polimerazo s predhodnim reverznim prepisom

SF – stacionarna faza

UHPLC – tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti

1. UVOD

1.1 VIRUS INFLUENCE

Virusi influence spadajo v družino *Orthomyxoviridae*. Virusi influence so sferične ali nitaste oblike, s premerom od 100 nm (sferični virusi) do 400 nm (nitasti virusi) in vsebujejo negativno polarno enovijačno RNA (1, 7).

Na površini virusa se nahajajo glikoproteini, med katerimi sta pomembna predvsem hemaglutinin (H) in nevraminidaza (N). Ti dajejo virusu podobo osata, hkrati pa sta hemaglutinin in nevraminidaza najpomembnejši beljakovini za razvrščanje virusa influence A. Hemaglutinin omogoča virusu dostop v celico preko receptorja, nevraminidaza pa pomaga pri oddvajanju viriona od okužene celice. (2, 4, 7)

Viruse influence razvrstimo v tri tipe: tip A, B in C. Te ločimo med seboj na podlagi nukleokapsidne beljakovine (NP), ki je specifična za vsak tip virusa influence. (7) Viruse influence A delimo na podtipe virusa. Te delimo glede na različne hemaglutinine (H1 – H15) in nevraminidaze (N1 – N9), ki se nahajajo na površini virusa. (2, 7)

Virusa influence A in B vsebujeta osem segmentov RNA genoma, medtem ko tip C vsebuje le sedem segmentov. Ti so razporejeni po njihovi padajoči dolžini. Pri virusih influence A in B segment 1 kodira podenoto polimeraze – PB2, segment 3 kodira drugo podenoto polimeraze - PA, ki služi za proteazno aktivnost, segment 4 kodira hemaglutinin, segment 5 beljakovino NP, ki veže RNA molekule. Pri vseh virusih influence segment 2 kodira polimerazno podenoto PB1, ki služi za podaljševanje RNA. Segment 6 pri influenci A kodira nevraminidazo, medtem ko pri influenci B kodira tako nevraminidazo kot membransko beljakovino NB, ki je podobna beljakovini M2 virusa influence A. 7. segment pri obeh virusih (influenca A in B) kodira matrično beljakovino - M1, delno pa kodira tudi beljakovino M2 pri virusu influence A in membransko beljakovino BM2 pri virusu influence B. Prav tako oba virusa vsebujeta 8. segment, ki pri obeh kodira interferon-antagonistično beljakovino (NS1) in NEP/NS2, ki poskrbi za izločanje virusne RNA iz jedra gostiteljske celice. Podoben genom ima tudi virus influence C, le da ta vsebuje zapis za beljakovino HEF, ki nadomesti beljakovini nevraminidazo ter hemaglutinin in zato posledično vsebuje en segment manj kot prej omenjena tipa virusa. (4)

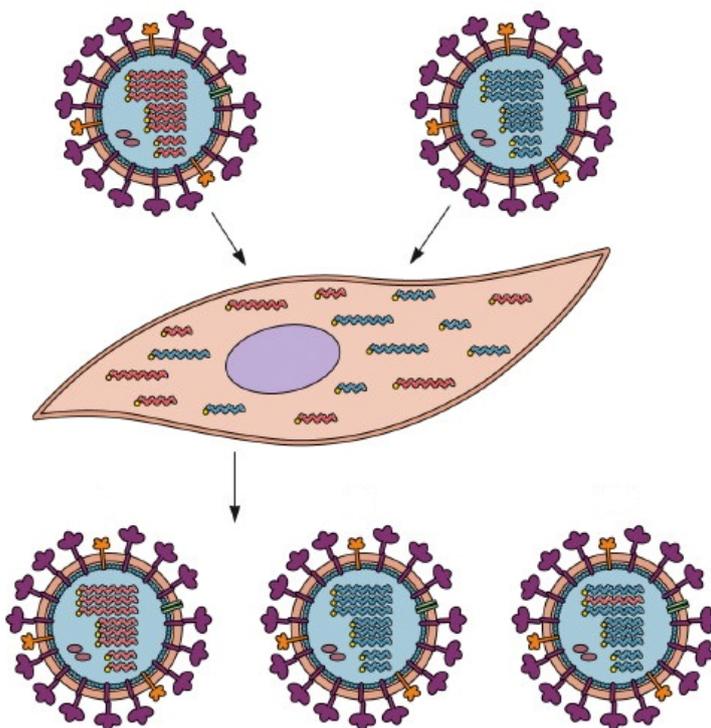
Epidemije povzročajo le virusi influence tipa A in B, medtem ko virusi tipa C povzročajo le občasne blage okužbe. (2, 7) Pandemije se pri človeku pojavljajo samo pri virusu influence A, kjer so prisotni podtipi, ki vsebujejo H1 – H3 in N1 ali N2. (4, 7) Epidemije influence A se pojavljajo na vsake 2 – 3 leta, epidemije influence B na 4 – 6 let. (7) Časovni razmik pojavov pandemij novonastalih podtipov virusov influence A ni znan, saj so se v zgodovini takšne pandemije pojavljale v različnih časovnih razmikih. (7)

Epidemije in pandemije se pri influenci A pojavljajo zaradi antigeneskih odmikov in premikov. Pri antigeneskem odmiku gre za točkovne mutacije (manjše antigeneske spremembe), pri čemer pride do novih sevov kjer je spremenjenih le nekaj aminokislin hemaglutinina ali nevraminidaze. (7) Novih sevov nevtralizacijska protitelesa v organizmu ne prepoznajo, zato imajo ti virusi večjo možnost za povzročitev bolezni. Pri antigeneskem premiku gre za genetsko prerazporeditev (večje antigeneske spremembe), kjer si različni podtipi virusov izmenjajo genske segmente, ki vsebujejo zapis za hemaglutinin in nevraminidazo. Da pride do antigeneskega premika, je nujno srečanje podtipov virusa iz različnih gostiteljev – človeka, ptic, prašiča. (5) Ker vsebujejo novonastali virusi povsem nove kombinacije nevraminidaze in/ali hemaglutinina, jih protitelesa v organizmu ne prepoznajo. Tako se influenza širi nemoteno, saj ljudje niso imuni, zato pride do pandemije. (5, 7)

Virus influence se prenaša kapljično preko dihal, ko okužena oseba kiha ali kašlja, možnost prenosa pa je tudi z neposrednim stikom in aerosoli. Virusi se po vdoru v organizem pritrdijo na migetalčne celice dihalnega epitelijskega tkiva, vanje vnesejo svoj dedni material, kjer se ta pomnoži. Okužene celice v naslednji fazi tvorijo virusne beljakovine in tako nastanejo novi virusi, ki se na koncu izločijo iz celice. Inkubacija virusa influence znaša 18 – 70 ur. Virus je mogoče dokazati že 24 ur pred nastopom bolezni. Pet do deset dni po nastanku bolezni pa virusa ne dokažemo več. Izjema so majhni otroci, ki imajo večjo vsebnost virusa. (1, 7) Bolezen se začne z vročino, glavobolom, bolečinami v mišicah, vnetim žrelom in suhim kašljem. (1) Bolezen traja 1 teden, če ne pride do zapletov. Bolniki z osnovno kronično boleznijo, nosečnice in starejši ljudje, gripo težje preboleajo hkrati pa imajo večjo možnost, da pride do zapletov. (7)

Na podlagi kliničnih znakov in rezultatov laboratorijskih analiz se zdravnik odloči za protivirusno zdravljenje, v kolikor je to potrebno. Za zdravljenje influence A se uporabljajo zdravila iz dveh skupin: v prvo spadata amantadin in rimantadin, v drugo pa zanamivir in oseltamivir. Prva skupina zdravil inhibira beljakovino M2 na virusni površini, druga pa encim nevraminidazo.

Bolezen lahko preprečimo s cepljenjem. Na tržišču so cepiva, ki temeljijo na inaktivaciji ali oslavitvi virusa vzgojenega v oplojenem kokošnjem jajcu. (2) Pri inaktiviranih cepivih so virusi inaktivirani s formaldehidom ali beta-propiolaktonom. Takemu cepivu pravimo mrtvo cepivo, ki ne povzroča bolezni, izzove pa zadovoljiv imunski odziv. Druga vrsta cepiv vsebuje oslavljen virus, pri katerem izzovejo mutacije in mu s tem zmanjšajo sposobnost za razmnoževanje ter povzročijo izgubo virulence. Takšnim cepivom pravimo živa cepiva. (5)



Slika 1: Nastajanje novih sevov influence A.

1.2 OPIS METOD IN KUŽNIN

1.2.1 Kužnine primerne za diagnostiko influence

Ljudem, ki kažejo klinične znake podobne gripi, lahko v diagnostične namene virus dokažemo v vzorcih dihal. Da bi to lahko storili optimalno, moramo že v predanalitski fazi (odvzem, transport, shranjevanje, obdelava vzorcev) paziti, da ne pride do napake. Napake so v predanalitski fazi pogoste in vodijo do neustreznih rezultatov.

Bolnikom pri katerih sumimo, da so okuženi z virusom influence, odvezamemo vzorce primerne za izvajanje laboratorijskih preiskav. Odvezamemo lahko: nazofaringealni aspirat, nazofaringealni izpirek, bris nazofarinksa in bris žrela. Najbolj primerna sta nazofaringealni aspirat in izpirek, ker pa je postopek odvzema teh težavnejši in bolj neprijeten za preiskovanca, v Sloveniji najpogosteje uporabljajo bris nazofarinksa in bris žrela. Možen je tudi hkraten odvzem obeh kužnin. Odvzeta brisa shranimo v eno epruveto z ustreznim transportnim gojiščem za viruse. Takšna vzorca sta primerna za uspešno detekcijo virusa. (9, 21) Bris nazofarinksa odvezamemo s predpisanim priborom, ki ga sestavlja bris, ki ima konec oblikovan v posebno krtačko. Brisi obstajajo v različnih velikostih. Bris pri odvzemu na rahlo potisnemo vodoravno skozi nosnico in tako nadaljujemo dokler ne dosežemo nazofarinksa. Paličico nekajkrat nežno zavrtimo in s tem odluščimo epitelne celice. Bris izvlečemo in ga potopimo v transportno virusno gojišče, tako da je ta potopljen v transportni tekočini 1 do 2 centimetra. Gojišče trdno zapremo, da pri transportu vzorca ne pride do razlitja vsebine transportne posodice. (13)

Vzorce je potrebno pravilno shraniti in transportirati, saj se v nasprotnem primeru njihova uporabnost zmanjša. Brise je potrebno shraniti v predpisana virusna transportna gojišča. Brisi morajo biti potopljeni v tekočino in se ne smejo izsušiti. (21)

Vzorce je potrebno transportirati do laboratorija v čim krajšem času pri 4⁰C. Nekaj dni jih lahko hranimo v hladilniku (4⁰C), ne smemo pa jih izpostavljati vročini. V kolikor jih ne inokuliramo na celično kulturo, jih po 72. urah zamrznemo na -70⁰C, vendar le, če ne bomo izvajali imunodetekcijskih testov. V tem primeru potrebujemo nepoškodovane celice, ki jih zamrzovanje in tajanje poškodujeta, zato test opravimo pred zamrzovanjem. (1, 21)

Pri izvajanju hitrega testa moramo upoštevati predpisana pravila. Vzorec za izvajanje hitrega testa mora biti odvzet in dan v virusno gojišče, v katerem ga tudi hranimo na 2 – 8 °C. Najbolje je, da vzorce analiziramo čim prej, lahko pa jih hranimo 48 ur prav tako na 2 – 8 °C. Pomembno je tudi, da je bris pravilno odvzet, in da ne vsebuje krvi. Vzorci primerni za izvajanje hitrega testa so nosni izpirek, nazofaringealni aspirat in bris nazofarinksa ali bris nosu.(3)



Slika 2: Odvzem brisa nazofarinksa.

1.2.2 Hitri imunokromatografski testi

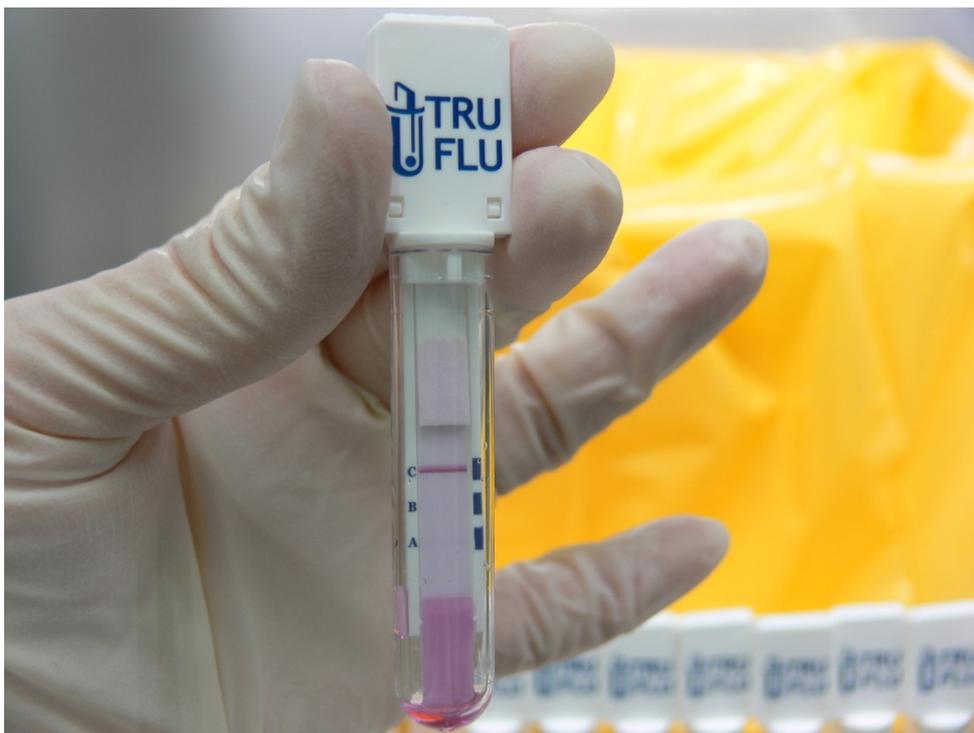
Hitri imunokromatografski testi so testi, s katerim lahko dokažemo prisotnost določenega virusa v kužnini. Ti testi temeljijo na imunokromatografskem principu, kjer so prisotna dvojna protitelesa. Primarna monoklonska protitelesa vežejo antigene (viruse ali njihove komponente), v kolikor so ti prisotni v vzorcu. Sekundarna protitelesa so vezana na nitrocelulozno membrano testnega lističa, na katera se vežejo kompleksi primarnih protiteles in antigenov. Sekundarna protitelesa na membrani so specifična in so pritrjena na mestu z oznako na testnem lističu. Poleg teh dveh oznak je na koncu membrane navadno še oznaka za notranjo kontrolo testa. Ti hitri testi pa poleg imunskega temeljijo tudi na kromatografskem principu. (3)

Pri kromatografiji se delci ločijo s porazdeljevanjem med mobilno (MF) in stacionarno fazo (SF), ki sta lahko v različnih agregatnih stanjih (plinska, tekočinska, na trdnih nosilcih). Vzorec je najprej v MF s katero potuje skozi SF. Pri tem pride do ločevanja, kjer se delci, ki so bolj topni v SF ali pa imajo večjo afiniteto do nje, porazdelijo vanjo. Če so sestavine bolj topne v MF, ali pa imajo manjšo afiniteto do SF, pa ostanejo v MF in tudi hitreje pripotujejo do konca kolone. Proces poteka, dokler ni dosežena popolna ločitev delcev. Glede na obliko stacionarne faze poznamo kolonsko (ločevanje na stolpcu SF), tankoplastno (ločevanje na tankih plasteh SF) in kapilarno kromatografijo (ločevanje na aktivnih površinah v kapilari). Glede na MF ločimo med plinsko kromatografijo (GC), kjer je MF v plinastem stanju, tekočinsko kromatografijo (LC), kjer je MF kapljevina, pri tej pa poznamo tudi tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), superkrično kromatografijo in UHPLC. (8)

Pri hitrih testih gre torej za tekočinsko tankoplastno kromatografijo, saj vzorec potuje z MF v tekočem stanju po tankih plasteh SF. Tu je MF testni reagent proizvajalca, ki je navadno priložen h kompletu, s katerim vzorec potuje. SF je nitrocelulozna membrana kjer so vezana sekundarna protitelesa. V kolikor so antigeni prisotni, se po vezavi kompleksov na sekundarna protitelesa mesto, na katerem so ta vezana, obarva. (3)

Poznamo več različnih hitrih testov za določanje influence A in B, ki temeljijo na podobnem principu. (15 – 18, 24, 25, 27, 28) Hitri antigenski testi so primerni zaradi njihove hitre izvedbe, in ker za izvajanje le teh ne potrebujemo posebno usposobljenega

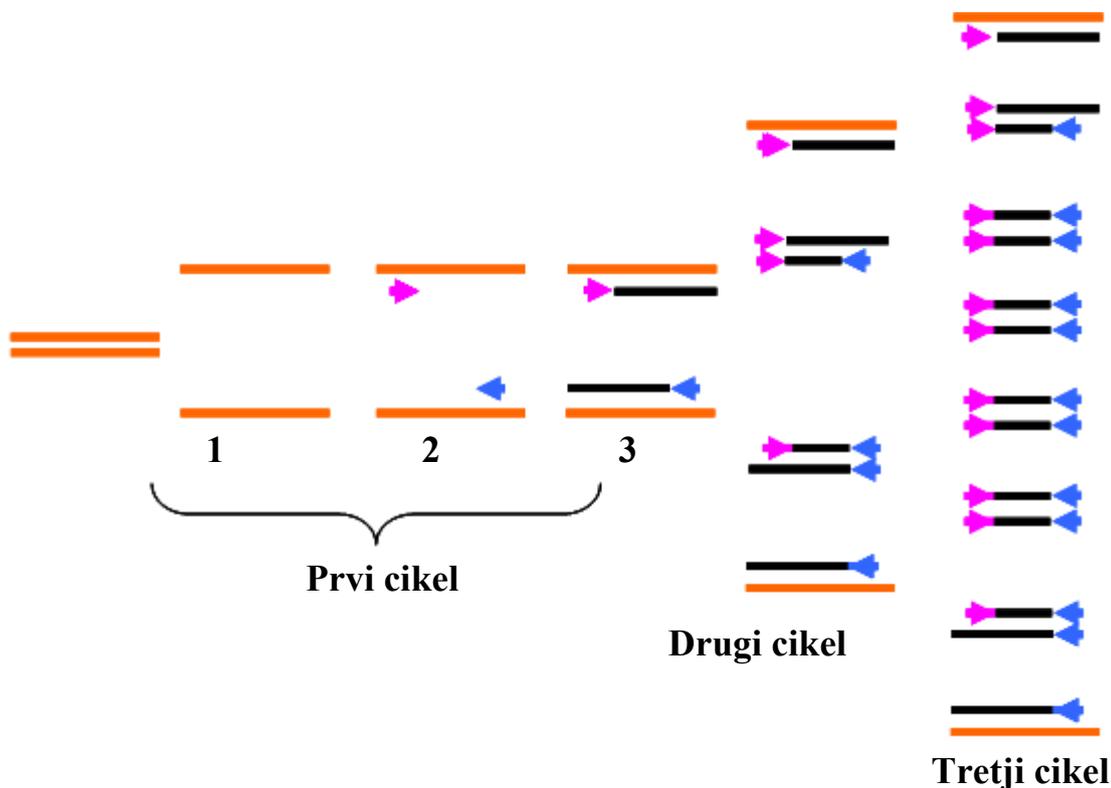
zdravstvenega osebja. (15, 16) Vendar iz raziskav različnih zdravstvenih ustanov poročajo o nizki občutljivosti teh testov, ki se kaže z lažno negativnimi rezultati. (15, 16, 24, 25, 28) Ti se lahko pojavijo tudi zaradi različnih nepravilnosti v predanalitskem in medanalitskem postopku ali zaradi nizke vsebnosti virusa. (15 – 18, 24, 25, 27, 28)



Slika 3: Hitri imunokromatografski test TRU FLU, kjer oznaka C označuje notranjo kontrolo testa. V kolikor je obarvana tudi oznaka A pomeni, da je prisoten virus influence A, če pa je obarvanost prisotna pri oznaki B pomeni, da so prisotni virusi influence B.

1.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času

Po letu 1990 so se v laboratorijski diagnostiki začele uporaljati molekularne metode, med katere spada tudi verižna reakcija s polimerazo (PCR - polymerase chain reaction). To metodo štejemo med metode dokazovanja nukleinskih kislin in je ena od bolj občutljivih in specifičnih. Poznamo več različic PCR metode, vse pa temeljijo na istem osnovnem principu. Ta sestoji iz treh osnovnih faz: v 1. fazi se DNA denaturira pri 95 °C, kjer se razkrene dvojna vijačnica in dobimo dve enojni vijačnici, v 2. fazi se na vsako od verig veže začetni oligonukleotid (pri 45 do 75 °C), ki se prilega na točno določeno mesto na verigi (komplementarnost) in 3. faza, ki sestoji iz podaljševanja z DNA-polimerazo in dokončne sinteze DNA verige pri 72 °C. Po koncu omenjenih treh faz dobimo podvojeno DNK, ki je že pripravljena za ponovno podvajanje.



Slika 4: Stopnje cikla pri PCR metodi: **1** - denaturacija in razklenitev dvovijačne DNK, **2** - pripenjanje začetnih oligonukleotidov, **3** - podaljševanje verige s polimerazo.

Opisane faze tvorijo en cikel, v katerem se količina DNA podvoji. Porast krivulje je torej v času podvojevanja tarčne DNK eksponentna, zato v nekaj urah (25 do 40 ciklih) dobimo obilno pomnožen tarčni odsek DNA. (5) Na koncu pridelek reakcije detektiramo z eno od metod, s katerimi lahko določimo prisotnost DNA oziroma RNA. To lahko izvedemo s horizontalno elektroforezo v agaroznem gelu, ki je hitra in enostavna metoda z nizko ceno, vendar jo je potrebno zaradi nizke občutljivosti elektroforeze v gelu potrditi še s kakšno bolj zanesljivo metodo. Bolj zanesljive so hibridizacijske metode oziroma druge različice PCR metode, kjer se uporabljajo različne fluorescentne komponente za detekcijo nastalega pridelka. (5, 11)

Poznamo več različic PCR metode in ena izmed njih je tudi RT-PCR metoda izvedena v realnem času (Real Time RT-PCR). RT-PCR pomeni, da izvajamo PCR metodo po obratnem prepisu RNA v cDNA z reverzno transkriptazo. (10) Da pa je metoda izvedena v realnem času, pa pomeni, da se po vsakem ciklu podvajanja izvaja detekcija novo nastalih produktov. Zaradi takšnega načina detekcije lahko porast krivulje opazujemo že med potekom metode.

Pri detekciji so pomembni trije faktorji: bazna linija, primarni prag fluorescence in cikel primarnega praga fluorescence. Bazna linija se nanaša na raven signala (pri začetnih ciklih), kjer se pojavi majhna razlika v fluorescenci. Pri določanju bazne linije moramo upoštevati dovolj ciklov, da se izognemo šumu oziroma ozadju (določenemu v prvih nekaj ciklih). Tu pa ne smemo upoštevati ciklov, kjer signal začne rasti nad ozadjem.

Primarni prag fluorescence je meja, kjer porast signala preseže signal bazne linije. Tu se loči signal podvajanja od ozadja. Analizator avtomatsko določi primarni prag fluorescence z 10 - kratno standardno deviacijo vrednosti fluorescence bazne linije.

Vrednost Ct predstavlja številko zaporednega cikla, kjer signal fluorescence preseže primarni prag fluorescence. Vrednost Ct lahko uporabimo za izračun količine DNK, saj je obratno sorazmerna prvotni tarčni DNK ali RNK v vzorcu. Vendar lahko izračun opravimo le, če v reakciji uporabimo standarde.

Pri metodi RT-PCR v realnem času poznamo več načinov merjenja fluorescence. Najbolj občutljiv in specifičen je način merjenja s pomočjo lovk. Te so specifična nukleotidna zaporedja, na katera sta lahko pripeta fluorokrom in dušilec. Med podvajanjem z DNK polimerazo se lovka, ki se specifično veže na matrično verigo, razcepi. Fluorokrom ustvari fluorescentni signal, ki se z vsakim nadaljnjim ciklom povečuje. Fluorokrom pred odcepitvijo ne fluorescira, saj mu zaviralec to preprečuje, ko pa se zaviralec in fluorokrom ločita in se oddaljujeta, fluorokrom prične fluorescirati. (11)

Pri RT-PCR metodi v realnem času analiza poteka hitro, saj jo opravimo v nekaj urah. Pri tej metodi je pomembno tudi to, da se v isti reakciji izvede podvajanje in merjenje, kar omogoča manjšo možnost kontaminacije (vzorca ni potrebno prenašati iz analizatorja, da bi izvedli merjenje). (11)

Metoda je visoko občutljiva (100%) in specifična, rezultati niso tako močno odvisni od kvalitete odvzetega vzorca kot pri nekaterih drugih metodah (npr. pri antigenskih testih). Je razmeroma hitra, saj rezultate dobimo po nekaj urah od sprejema vzorca. Zavedati pa se moramo, da je ta metoda še vedno razmeroma draga in zahteva izurjeno laboratorijsko osebje ter ustrezno opremljen laboratorij, zato je še vedno ni v širši uporabi. (9)

1.2.4 Osamitev nukleinskih kislin

Pred izvedbo RT-PCR metode v realnem času moramo vzorce primerno obdelati. V ta namen izvedemo osamitev nukleinskih kislin iz vzorca, pri čemer po končani osamitvi dobimo nepoškodovano nukleinsko kislino DNA oziroma RNA. (12) Tako se izognemo preostalim motečim snovem v vzorcu, ki bi lahko vplivale na nadaljnjo analizo. (32)

Za izvedbo osamitve nukleinskih kislin obstaja več različnih metod. V naši nalogi smo uporabili aparaturo MagNA Pure Compact (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija). Za izvedbo osamitve nukleinskih kislin na tej aparaturi potrebujemo posebej predpisano opremo, ki je priložena v kompletu (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I). Test temelji na principu vezave nukleinskih kislin na magnetne-steklene delce. Po vezavi nukleinske kisline na magnetne delce sledi spiranje z različnimi pufri in na koncu še sprostitvev (elucija) nukleinskih kislin v epruveto. V priloženi epruveti dobimo čiste nukleinske kisline brez motečih snovi, od tod pa lahko nadaljujemo z RT-PCR metodo v realnem času. (12)

Da pa lahko nadzorujemo uspešnost osamitve nukleinskih kislin in nadaljnjo reakcijo pomnoževanja pri RT-PCR metodi, moramo pred osamitvijo nukleinskih kislin v vzorec dodati interno kontrolo. Interna kontrola vsebuje znano zaporedje določenega virusa, katero se pri RT-PCR metodi pomnoži. Če se ta ne pomnoži, pomeni, da izolacija nukleinskih kislin ni bila uspešna, ali pa, da je prišlo do napake v delovanju komponent RT-PCR metode. (31)

1.2.5 Poskus osamitve virusov

Danes se metode osamitve virusov manj uporabljajo, saj moramo na rezultate čakati dlje časa (od nekaj dni do nekaj tednov). Med drugim so te metode odvisne od kvalitete odvzetega vzorca in njihovega shranjevanja. (5, 9) Vzorci morajo biti odvzeti v prvih 3 dneh od pojava simptomov. Takoj po odvzemu moramo vzorec dati na led in ga čim prej inokulirati v celično kulturo. (22)

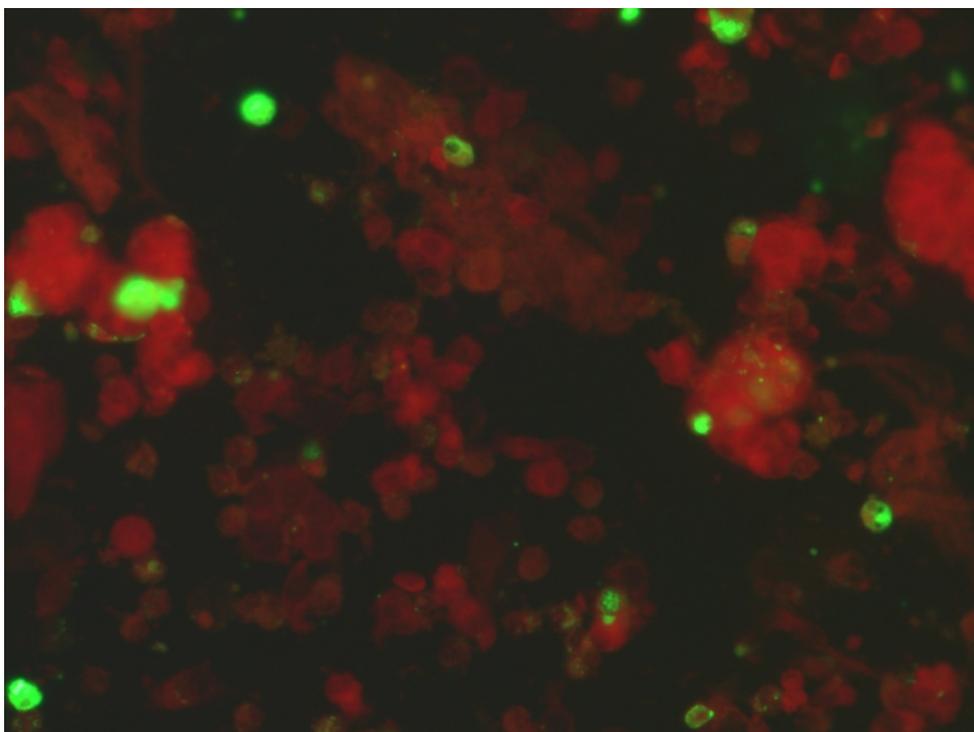
Poznamo več različnih načinov osamitve virusov. Viruse razmnožujemo v: celičnih kulturah, na poskusnih živalih in v oplojenih kokošjih jajcih. Celične kulture delimo na primarne, diploidne in trajne celične kulture. (5)

Za osamitev virusov influence A in B se uporabljajo oplojena kokošja jajca. Viruse moramo inokulirati v amnijsko votlino, v kateri se virusi influence v 48 urah namnožijo. Te lahko dokažemo s hemaglutinacijo eritrocitov. (5)

1.2.6 Imunodetekcija virusnih antigenov

Virusne antigene dokazujemo z metodami, ki temeljijo na imunofluorescenci (vezava označenih protiteles na antigene). Pri imunodetekcijskih metodah se za razliko od drugih odkriva virusne antigene in ni potrebno, da je v kužnini prisoten infektivni virus. Pri teh metodah se na antigene vežejo specifična monoklonska protitelesa označena s fluorescein izotiocianatom (FITC). FITC absorbira modro svetlobo in oddaja rumenozeleno. Rezultate na koncu odčitamo s pregledom celic pod fluorescentnim mikroskopom na 200 do 500-kratni povečavi, kjer na temnem polju jedra okuženih celic svetijo zeleno, citoplazma in neokužene celice pa rdeče. (5, 6) Antigene lahko dokazujemo direktno ali indirektno. (6) Indirektna imunofluorescenca za razliko od direktne vsebuje več korakov in se jo zato manjkrat uporablja. (5)

Imunodetekcijske metode so občutljive (60% - 100%), specifične in hitre (izvedba traja 2 - 4 ure). (9) Njene slabosti so le te, da za pravilno prepoznavanje negativnih od pozitivnih rezultatov potrebujemo izurjeno laboratorijsko osebje, in da niso tako občutljive in specifične kot metode PCR. (9)



Slika 5: Fluorescenca pri pozitivnem vzorcu na influenco A.

1.3 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Občutljivost in specifičnost sta parametra, ki ju uporabljamo pri vrednotenju novega testa. Z njima opredelimo odstotek pravilno pozitivnih in negativnih rezultatov kar pomeni, da rezultati testa ustrezajo stanju bolnika (pozitivni rezultati pri pacientih s prisotno boleznijo in negativni rezultati pri pacientih brez prisotnosti bolezni). (2, 31)

1.3.1 Občutljivost

Je vrednost, ki označuje dejansko pozitivne vrednosti oziroma pravilno pozitivne rezultate (pozitivni rezultati pri pacientih s prisotno boleznijo). (31)

$$\text{Občutljivost} = \frac{\text{št. pravilno pozitivnih rezultatov}}{\text{št. pravilno pozitivnih} + \text{št. lažno negativnih rezultatov}} \cdot 100\%$$

1.3.2 Specifičnost

Je vrednost, ki označuje dejansko negativne vrednosti oziroma pravilno negativne rezultate (negativni rezultati pri pacientih, pri katerih ni prisotna bolezen). (31)

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{št. pravilno negativnih rezultatov}}{\text{št. pravilno negativnih} + \text{št. lažno pozitivnih rezultatov}} \cdot 100\%$$

2. NAMEN DELA

Vsako leto se pri nas in po svetu pojavljajo epidemije influence, ki jih povzroča virus influence A. Na vsakih nekaj let izbruhnejo tudi pandemije. Tako se je v jeseni leta 2009 pojavila pandemija nove influence A tipa H1N1. Zaradi možnosti zdravljenja s protivirusnimi zdravili bi bilo za ogrožene bolnike s hudo klinično sliko bolezni zelo zaželeno, da bi etiološko diagnozo postavili takoj ali čim prej ob prvem pregledu bolnika. Čim prejšnja diagnoza je pomembna tudi zaradi izolacije bolnika, okuženega z influenco, z namenom, da bi zmanjšali možnost širjenja okužb.

V diplomski nalogi smo želeli primerjati hitri imunokromatografski test TRU FLU z referenčno metodo verižno reakcijo s polimerazo - PCR.

V nalogi smo želeli ugotoviti, kakšna je občutljivost in specifičnost hitrega imunokromatografskega testa za dokaz virusnih antigenov virusa influence A v primerjavi z referenčno metodo PCR. Rezultate smo želeli ovrednotiti tudi glede na starost preiskovancev in relativno količino virusa v preiskovanih vzorcih kot jo opredeli reakcija PCR.

Hipoteze:

- Hitri testi za dokazovanje okužb z virusom influence A imajo nizko občutljivost in visoko specifičnost.
- Rezultati hitrega testa so odvisni od vsebnosti količine virusa influence A.
- Otroci imajo večje virusno breme kot odrasli.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA VZORCEV

Vsak vzorec, ki smo ga prejeli v laboratorij, smo morali najprej primerno obdelati in pripraviti za nadaljne postopke. Transportno gojišče v katerem sta se nahajala transportni medij in bris, smo dobro pretresli na vrtinčniku in s tem celice, ki smo jih dobili z brisom, sprostiti v transportni medij. Za izvedbo hitrega testa in metode RT-PCR smo vzorce prelili v manjše epruvete in nadaljevali z analiznimi postopki.

3.2 HITRI TEST TRU FLU

3.2.1 Vsebina kompleta

- Epruveta s konjugiranimi protitelesi vezanimi na delce zlata
- Testni trak z oznakami A, B in C, kjer so vezana specifična monoklonska protitelesa
- Reagent (tudi negativna kontrola)
- Plastične pipete za enkratno uporabo

Material za izvedbo hitrega testa, ki ni priložen

- Ura
- Termometer
- Zaščitna oprema (rokavice, zaščitna obleka, maska za usta in nos)
- Zaščitna komora
- Vrtinčnik

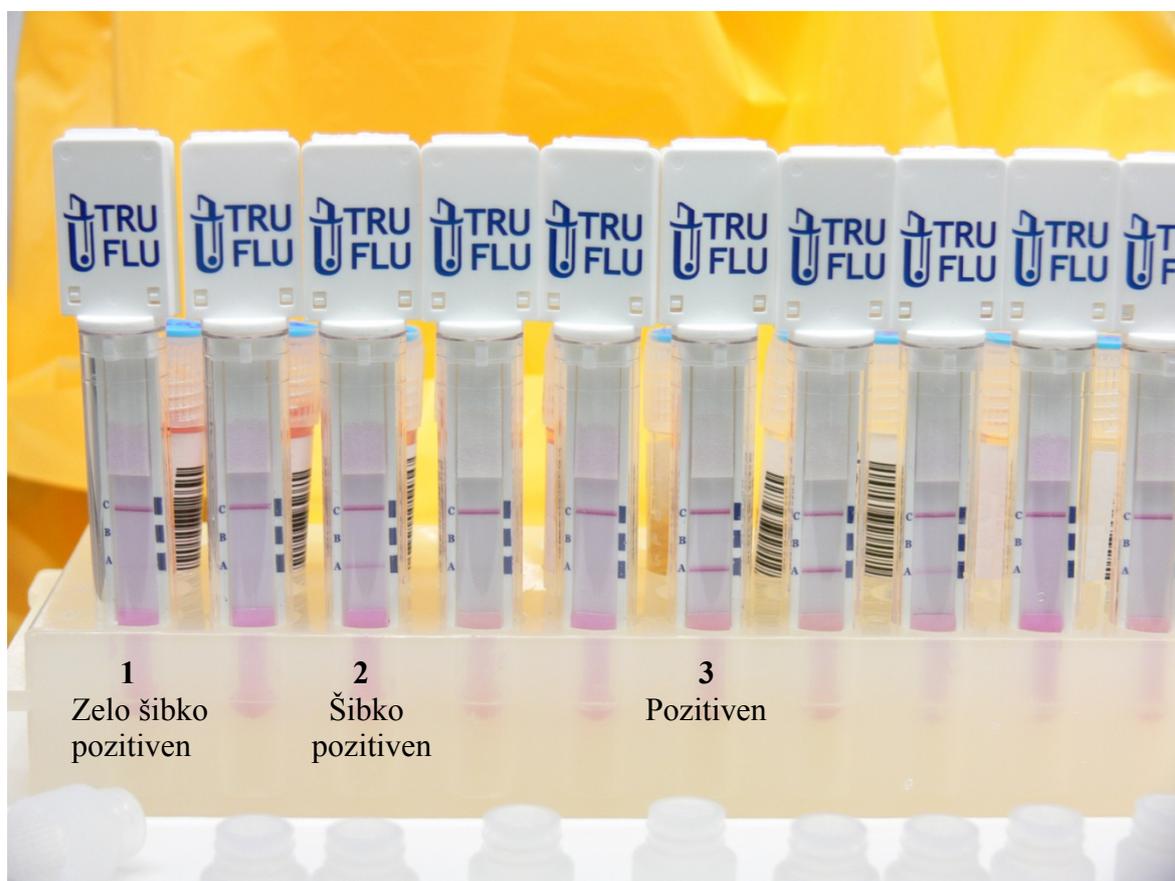
3.2.2 Potek testa

Pred začetkom testiranja vse vzorce in reagente, ki so potrebni za izvedbo hitrega testa ogrejemo na sobno temperaturo (20 – 25 °C). Nato priloženo epruveto, ki vsebuje koloidne delce, označimo, da ne pride do zamenjave vzorcev. V le to dodamo 100 µl vzorčnega reagenta in dobro premešamo. Za tem prav tako odpipetiramo 100 µl preiskovanega vzorca v isto epruveto in dobro premešamo (3-krat stisnemo plastično pipeto ali zvrtničimo na vrtinčniku 10 sekund). Testni trak fiksiramo v epruveto z vzorčnim reagentom in vzorcem, vsebino inkubiramo 15 minut na 20 - 25 °C nato pa odčitamo rezultat v roku 1 minute.

3.2.3 Vrednotenje rezultatov hitrega testa

Hitre teste smo vrednotili glede na njihovo obarvanost na testnem traku. Na vsakem testnem traku se mora po inkubaciji pokazati rdeče-rožnata črta na mestu pozitivne, notranje kontrole (C) kar pomeni, da je test veljaven. Če se ta črta ne pojavi, moramo test ponovno izvesti z novim materialom. Ko se obarva le črta na mestu kontrole, je test negativen. Če se poleg kontrolne črte obarva še mesto kjer je črka A, to kaže na pozitiven rezultat vzorca na influenco A. Prav tako je lahko obarvano tudi mesto B (poleg kontrolne črte) kar pomeni, da je vzorec pozitiven na influenco B. V kolikor se pojavijo vse tri črte (na mestu A, B in C) moramo test ponoviti, saj je hkratna okužba z obema tipoma influence (A in B) zelo redka. Na označenih mestih se lahko pojavijo rahlo rožnate črte pri čemer moramo biti previdni, saj lahko gre za lažno pozitivne vzorce.

Zaradi različne intenzitete obarvanja na testnem traku, smo glede na le to razdelili rezultate na tri skupine. Intenziteto obarvanosti na označenih mestih (A) smo primerjali z intenziteto obarvanosti kontrole (na mestu C). Vzorce, pri katerih je bila intenziteta obarvanosti enako močna ali močnejša kot na mestu kontrole, smo označili kot pozitivne. Vzorce kjer je bila intenziteta obarvanja manjša, glede na obarvanje pri kontroli, smo opredelili kot šibko pozitivne. Vzorce pri katerih je bila intenziteta obarvanja komaj vidna v primerjavi s kontrolo pa smo opredelili kot zelo šibko pozitivne.



Slika 6: Različna intenziteta obarvanja na testnih trakovih hitrega testa.

3.3 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN Z APARATURO MagNA PURE COMPACT

3.3.1 Vsebina kompleta (MagNA Pure Compact nucleic acid isolation kit I, Roche, Basel, Švica)

- 32 reagenčnih kartuš (vsaka vsebuje: proteinazo K, razgradni pufer, magnetno-stekleni delci, pufer za spiranje I, II in III, elucijski pufer)
- 32 podstavkov z nastavki za pipetiranje (vsak podstavek vsebuje 2 velika nastavka in 1 mali nastavek za pipetiranje ter 1 nastavek za prebadanje folije na reagenčni kartuši)
- 35 (2,0 ml) vzorčnih epruvetk
- 35 (2,0 ml) elucijskih epruvetk označenih s kodami
- 35 pokrovčkov za zapiranje elucijskih epruvetk

Material potreben za uspešno izvajanje izolacije nukleinskih kislin, ki ni priložen kompletu (MagNA Pure Compact nucleic acid isolation kit I):

- pipete ter ustrezni nastavki za pipete, ki omogočajo prenos kužnine v vzorčno epruveto brez prenosa nukleaz in povzročanja ali prenosa aerosolov v okolje
- centrifuga in njena dodatna oprema
- interna kontrola (EAV, EHV1)
- zaščitna oprema (rokavice iz lateksa, halja, maska za usta in nos)
- zaščitna komora
- vrtinčnik

3.3.2 Potek osamitve nukleinskih kislin

Nukleinske kisline iz vzorca osamimo s kompletom MagNA pure compact nucleic acid isolation kit I z biorobotom MagNA pure compact (Roche, Basel, Švedska). Pri osamitvi nukleinskih kislin uporabimo zaščitna sredstva, da bi zavarovali sebe pa tudi, da ne bi prihajalo do kontaminacije vzorcev. Pripravimo ves potreben material in ga ogrejemo na sobno temperaturo (21 – 25 °C). Vse reagente tik pred uporabo premešamo. Nato v zaščitni komori v priloženo epruvetko odpipetiramo 10 µL interne kontrole, ki sestoji iz 5 µL interne kontrole za DNK respiratorne viruse - EHV1 (Equine herpesvirus) in 5 µL interne kontrole EAV (Equine arteritis virus) za RNK respiratorne viruse. V isto epruvetko dodamo 190 µL vzorca. Zamenjamo si rokavice, saj v naslednjih fazah postopka posegamo v čistejšo okolje – v samo aparaturo, kjer se kasneje izvaja osamitev nukleinskih kislin. V stojala, ki so del aparature, vstavimo kartuše z reagenti, nastavke za pipetiranje, elucijske epruvetke in vzorce, ki smo jih poprej pripravili za osamitev nukleinskih kislin. Po pravilno nastavljenih funkcijah v programu aparature osamitev v aparatu poteka v naslednjih korakih:

- liza celic v vzorcu s proteinazo K in s kaotropnimi solmi
- nukleinske kisline se vežejo na površino magnetno-steklenih delcev
- sledi trikratno spiranje nevezanih snovi s tremi pufri za spiranje
- na koncu postopka se nukleinske kisline sperejo iz magnetno-steklenih delcev z elucijskim pufrom, v elucijsko epruveto

Po končani izolaciji nukleinskih kislin na ekranu preverimo za vsak vzorec posebej ali je bil postopek uspešno izveden, saj moramo v nasprotnem primeru postopek ponoviti. Pri uspešno izvedenem procesu vzorcev, elucijske epruvetke dobro zapremo, jih označimo in jih v primeru, da nukleinskih kislin ne uporabimo takoj, zamrznemo na –20 °C.

3.4 METODA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO S PREDHODNJIM OBRATNIM PREPISOM V REALNEM ČASU (rRT-PCR)

3.4.1 Komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative Kit (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA)

- Mešanica reverzne transkriptaze in DNA polimeraze
- 2-krat reakcijska mešanica, ki sestoji iz pufra, 0,4 µM vsakega od deoksinukleotid trifosfatov (dNTP) in 6 µM MgSO₄
- 50 mM MgSO₄
- ROX barvilo za izravnavo primarne fluorescence

Reakcijska mešanica za izvajanje RT-PCR metode:

- SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix
- Začetni oligonukleotidi (Flu-F A1, Flu-F A2, Flu R)
- Lovke (FluA-P-FAM)
- 2-krat koncentrirana reakcijska mešanica
- Sterilna, destilirana voda, ki ne vsebuje DN-az in RN-az (dd H₂O)

Preostali potreben material, reagenti in aparature za izvedbo analize:

- Negativna in pozitivna kontrola
- Analizator StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA)
- Mikrocentrifuga
- Vrtinčnik
- Nastavljive pipete (20 µL in 200 µL)
- Nastavki za pipete z aerosolno bariero
- Reakcijska ploščica z 0,2 mL vdolbinicami
- Ohlajeno stojalo za ploščico z reakcijskimi vdolbinicami
- Sterilne 1,5 mL mikrocentrifugirne epruvete brez prisotnosti nukleaz
- Zaščitna oprema (rokavice, zaščitna obleka, maska za nos in usta)

3.4.2 Potek rRT-PCR metode

Za izvedbo rRT-PCR metode smo uporabili komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA), analizo pa izvedli v aparaturi StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). V zaščitni komori smo pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala reagente iz zgoraj navedenega kompleta, začetne oligonukleotide, lovke in ddH₂O. Nato smo reakcijsko mešanico odpipetirali v vdolbinice na reakcijski ploščici. V ločeni zaščitni komori smo odpipetirali vzorce in pozitivne ter negativne kontrole v iste vdolbinice v katere smo prej dali reakcijsko mešanico. Tako pripravljeno reakcijsko ploščico smo postavili v aparaturo, na kateri smo že na začetku nastavili zelene funkcije v programu namenjenemu aparaturi. Po končanem procesu smo s pomočjo omenjenega programa odčitali rezultate.

3.4.3 Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetkov in lovke

Flu-F A1 (oligonukleotid): TCATGGAGTGGCTAAAGACAAGAC

Flu-F A2 (oligonukleotid): TCATGGAATGGCTAAAGACAAGAC

Flu R (reverzni oligonukleotid): GGCACGGTGAGCGTGAA

FluA-P-FAM (lovka): TCACCTCTGACTAAGGG

4. REZULTATI

Testirali smo vzorce 120 pacientov, ki so bili sprejeti v Univerzitetni klinični center v Ljubljani na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja od 30. 11. 2009 do 21. 12. 2009. V testiranje smo vključili 77 brisov nazofarinksa, 6 brisov žrela in 37 kombiniranih brisov (bris žrela in bris nazofarinksa skupaj v enem transportnem gojišču). Med 120 preiskovanci je bilo 65 moških in 55 žensk. Od vseh preiskovanih je bilo 60 otrok, med katere smo šteli vse, ki so bili stari do vključno 16 let, ter 60 odraslih, med katere smo šteli vse, ki so bili stari 17 ali več let. Najmlajši preiskovanec pri otrocih je bil star 8 mesecev, najstarejši pa 16 let, medtem ko so bili pri odraslih najmlajši stari 17, najstarejši pa 74 let. Povprečna starost pri otrocih je znašala 3,5 let, pri odraslih je znašala 43,5 let.

4.1 REZULTATI HITREGA IMUNOKROMATOGRFSKEGA TESTA

S hitrim imunokromatografskim testom (TRU FLU) smo testirali vseh 120 vzorcev na influenco A in B, ki so bili vključeni v nalogo. Pri testiranju s tem testom na influenco A smo od celote (120 vzorcev) dobili 20 (16,7%) pozitivnih rezultatov, od tega 15 (25%) pri otrocih in 5 (8,3%) pri odraslih. Pozitivne rezultate smo razdelili na pozitivne (9 vzorcev), šibko pozitivne (6 vzorcev) in zelo šibko pozitivne (5 vzorcev). Pri vseh vključenih otrocih (60) smo za pozitivne odčitali 8 (13,3%), za šibko pozitivne 4 (6,7%) za zelo šibko pozitivne pa 3 (5%) vzorce. Pri vseh odraslih, vključenih v nalogo (60), smo odčitali 1 (1,7%) pozitiven vzorec, 2 (3,3%) šibko pozitivna in prav tako 2 (3,3%) zelo šibko pozitivna vzorca.

Z istim hitrim imunokromatografskim testom, nismo zaznali nobenega rezultata, ki bi kazal na okužbo z influenco B.

4.2 REZULTATI METODE RT-PCR V REALNEM ČASU

Vse vzorce, ki so bili vključeni v nalogo (120 vzorcev) smo testirali tudi z metodo verižne reakcije s predhodnim obratnim prepisom v realnem času (RT-PCR). Pri tej metodi je bilo od 120 vzorcev 46 (40%) pozitivnih in 74 (60%) negativnih rezultatov. Od 60 vzorcev otrok je bilo 26 (43,3%) pozitivnih in 34 (56,7%) negativnih rezultatov, od 60 vzorcev odraslih oseb pa 20 (33,3%) pozitivnih in 40 (66,7%) negativnih rezultatov. Rezultate metode RT-PCR smo opredelili tudi glede na vrednosti Ct, katerim smo izračunali povprečje. Pri otrocih je povprečna vrednost Ct preiskovanih vzorcev znašala 24,8 pri odraslih pa 27,7.

4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV HITREGA IMUNOKROMATOGRFSKEGA TESTA Z REZULTATI RT-PCR METODE V REALNEM ČASU

Rezultate hitrega imunokromatografskega testa smo primerjali glede na vrednosti Ct metode RT-PCR katere kažejo na količino virusa v vzorcu. Od vseh 120 vzorcev je bilo 20 (16,7%) takšnih, ki so bili hkrati pozitivni na influenco A pri hitrem testu in pri metodi RT-PCR. Povprečje njihovih vrednosti Ct pri metodi RT-PCR je znašalo 20,2, povprečna starost pacientov, od katerih so ti vzorci bili pa 8,9 let. Najvišja vrednost Ct metode RT-PCR, pri kateri je hitri test še pokazal pozitiven rezultat, je znašala 24,6.

Od 20 pozitivnih vzorcev pri obeh metodah jih je bilo 15 (25%) pri otrocih in 5 (8,3%) pri odraslih. Povprečna vrednost Ct pri otrocih je znašala 20,0 med tem, ko je pri odraslih znašala 25,4.

Pri primerjavi hitrega testa z metodo RT-PCR je bilo med vsemi testiranimi vzorci (120 vzorcev) 28 (23,3%) vzorcev takšnih, ki so bili na influenco A pri RT-PCR metodi pozitivni, hkrati pa negativni pri hitrem imunokromatografskem testu (lažno negativni rezultati). Od 28 takšnih vzorcev je bilo 13 (21,7%) primerkov pri otrocih in 15 (25%) pri odraslih. Povprečna vrednost Ct teh vzorcev je znašala 30,2. Pri otrocih je vrednost Ct znašala 28,4, medtem ko je pri odraslih znašala 30,1. Povprečna starost vseh 28 pacientov je znašala 24,1 let.

Takšnih vzorcev, ki bi bili negativni po metodi RT-PCR in hkrati pozitivni pri hitrem imunokromatografskem testu (lažno pozitivni rezultati), ni bilo.

Glede na razdelitev rezultatov pri hitrem testu na pozitivne, šibko pozitivne in zelo šibko pozitivne rezultate, smo te primerjali s vrednostmi Ct metode RT-PCR. Pri pozitivno opredeljenih rezultatih hitrega testa smo izračunali povprečno vrednost Ct, ki je znašala 18,5, povprečna starost preiskovancev pa 6,6 let. Pri šibko pozitivnih rezultatih hitrega testa je povprečna vrednost Ct znašala 20,1, povprečna starost preiskovancev 10,8 let, pri zelo šibko pozitivno opredeljenih rezultatih pa je povprečna vrednost Ct znašala 23,1, medtem, ko je povprečna starost preiskovancev znašala 10,6 let.

Tabela 1: Prikazuje primerjavo rezultatov med metodama PCR in hitrim testom pri vseh pacientih.

		RT-PCR (Inf A)		Skupaj
		Pozitivni	Negativni	
Hitri test (Inf A)	Pozitivni	20 (16,7%)	0 (0%)	20 (16,7%)
	Negativni	28 (23,3%)	72 (60%)	100 (83,3%)
Skupaj		48 (40%)	72 (60%)	120 (100%)

Tabela 2: Prikazuje primerjavo rezultatov med metodama RT-PCR in hitrem testu ter njihove odstotke pri otrocih starih do vključno 16 let.

		RT-PCR (Inf A)		Skupaj
		Pozitivni	Negativni	
Hitri test (Inf A)	Pozitivni	15 (25%)	0 (0%)	15 (25%)
	Negativni	13 (21,7%)	32 (53,3%)	45 (75%)
Skupaj		28 (46,7%)	32 (53,3%)	60 (100%)

Tabela 3: Prikazuje primerjavo rezultatov med metodama RT-PCR in hitrim testom ter njihove odstotke pri odraslih.

		RT-PCR (Inf A)		Skupaj
		Pozitivni	Negativni	
Hitri test (Inf A)	Pozitivni	5 (8,3%)	0 (0%)	5 (8,3%)
	Negativni	15 (25%)	40 (66,7%)	55 (91,7%)
Skupaj		20 (33,3%)	40 (66,7%)	60 (100%)

4.4 IZRAČUN OBČUTLJIVOSTI IN SPECIFIČNOSTI

Pri vrednotenju novega testa sta ena bolj pomembnih parametrov njegova občutljivost in specifičnost, ki smo ju izračunali iz že prej opisanih formul. Občutljivost smo izračunali iz pravilno pozitivnih (20) in lažno negativnih rezultatov (28). Občutljivost hitrega testa je znašala 41,7 %.

$$\text{Občutljivost} = \frac{\text{št. pravilno pozitivnih rezultatov}}{\text{št. pravilno pozitivnih} + \text{št. lažno negativnih rezultatov}} 100\% =$$
$$\frac{20}{20+28} = 0,417 = 41,7 \%$$

Specifičnost smo izračunali iz pravilno negativnih (72) in lažno pozitivnih (0) rezultatov. Ker pri hitrem testu nismo zaznali nobenega lažno pozitivnega rezultata, je specifičnost znašala 100%.

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{št. pravilno negativnih rezultatov}}{\text{št. pravilno negativnih} + \text{št. lažno pozitivnih rezultatov}} 100\% =$$
$$\frac{72}{72+0} = 1 = 100 \%$$

Ker se vsebnost virusa pri odraslih in otrocih razlikuje, nas je zanimalo, kakšna je občutljivost hitrega imunokromatografskega testa pri teh dveh skupinah. Pri otrocih je znašala 53,6%, pri odraslih pa 25%.

$$\text{Občutljivost (otroci)} = \frac{15}{15+13} 100 = 53,6\%$$

$$\text{Občutljivost (odrasli)} = \frac{5}{5+15} 100 = 25\%$$

5. RAZPRAVA

Bolniki, ki so oboleli z gripo, kažejo znake, ki so podobni drugim okužbam dihal. Pomembno vlogo zato pri čim hitrejši diagnozi in nadaljnjem ukrepanju igrajo testi, s katerimi dobimo rezultate v kratkem času, so dovolj zanesljivi, so enostavni za izvajanje in so cenovno ugodni. Takšni bi lahko bili hitri antigenski testi, ki se lahko izvajajo ob pacientu takoj po odvzemu vzorca. Večinoma se uporabljajo na klinikah, ambulantah, ordinacijah in drugih zdravstvenih ustanovah in prav zaradi večje uporabe teh je zelo pomembno, da so testi pred uporabo preizkušeni in ovrednoteni.

Zaradi pojava pandemije nove gripe leta 2009, bi bila uporaba hitrih testov zaradi njihovih pozitivnih lastnosti priporočljiva, vendar moramo pred uporabo vedeti, kako učinkoviti oziroma občutljivi in specifični so.

V diplomski nalogi smo primerjali enega od hitrih imunokromatografskih testov (TRU FLU, Meridian Bioscience, Inc., Ohio, ZDA) z RT-PCR metodo, ki je ena najbolj občutljivih in specifičnih metod.

Ko smo primerjali rezultate hitrega testa z metodo RT-PCR, smo ugotovili, da je bilo pri hitrem testu 28 rezultatov negativnih, medtem ko so bili pri primerjalni molekularni metodi pozitivni. Takšnim rezultatom pravimo lažno negativni. V našem primeru je bilo takšnih vzorcev 23,3%. Hkrati noben vzorec ni bil takšen, ki bi bil pri RT-PCR metodi negativen, pri hitrem testu pa pozitiven.

Iz podatkov smo z že prej omenjenimi formulami izračunali občutljivost hitrega testa, ki je znašala 41,7% in specifičnost, ki je znašala 100%. Iz navedenega lahko predvidevamo, da s hitrim testom ne zajamemo vseh vzorcev, ki vsebujejo virus influence A. Če pa s hitrim testom vzorcem določimo prisotnost virusa, je rezultat specifičen.

Pri izvajanju hitrega imunokromatografskega testa smo opazili, da je sicer potek le tega enostaven, vendar so lahko rezultati dvoumni. Intenziteta obarvanosti na testnem traku hitrega testa ni vedno enaka, zato lahko pride do subjektivnega odčitavanja rezultatov. Tako lahko oseba, ki odčitava rezultate, obarvanosti na testnem traku zaradi majhne intenzitete obarvanja ne vidi. Rezultat odčita za negativnega namesto pozitivnega.

Zaradi različne intenzitete obarvanja pri hitrem testu smo rezultate, glede na obarvanost na testnem traku, razdelili na tri skupine in jih opredelili kot pozitivne, šibko pozitivne in zelo šibko pozitivne. Posamezne skupine smo nato primerjali s Ct vrednostmi RT-PCR metode in ugotovili, da so bile pri pozitivnih rezultatih vrednosti najmanjše (povprečna Ct vrednost je znašala 18,5), pri šibko pozitivnih malo večje od prejšnjih (povprečna Ct vrednost je znašala 20,1), pri zelo šibko pozitivnih rezultatih pa največje (povprečna Ct vrednost je znašala 23,1). Razlika med povprečnimi vrednostmi Ct skupin je bila 2 do 3, kar pomeni, da so vzorci iz skupine pozitivnih rezultatov vsebovali več virusa kot vzorci iz skupin šibko pozitivnih in zelo šibko pozitivnih rezultatov. Te ugotovitve smo postavili, na podlagi dejstva, da je vrednost Ct obratno sorazmerna z vsebnostjo virusne RNK v vzorcu. Iz navedenega sklepamo, da je intenziteta obarvanja na testnem traku hitrega testa verjetno odvisna od vsebnosti količine virusa v vzorcu.

Zaradi možnih odstopanj rezultatov glede na starost bolnikov, smo preiskovance razdelili na otroke in odrasle in primerjali njihove rezultate. Povprečna vrednost Ct vzorcev pri metodi RT-PCR je bila pri otrocih manjša (23,6) kot pri odraslih (27,7) kar kaže, da so imeli otroci večjo vsebnost virusa v vzorcih kot odrasli.

Prav tako je bil pri otrocih manjši tudi delež lažno negativnih rezultatov (otroci – 21,7%, odrasli – 25%), kar bi zopet lahko bila posledica večje vsebnosti virusa pri otrocih, s tem pa tudi večja intenziteta obarvanja hitrega testa.

Rezultate opisane v zgornjih treh skupinah (pozitivni, šibko pozitivni in zelo šibko pozitivni rezultati) med otroci in odraslimi nismo mogli primerjati, saj je število vzorcev pri odraslih premajhno.

Posebej smo izračunali občutljivost preiskovanega hitrega testa pri otrocih, ki je znašala 53,6% in pri odraslih, ki je znašala 25%. Razlika v občutljivosti je 28,6%, iz česar lahko sklepamo, da je hitri test pri odraslih slabše občutljiv kot pri otrocih. To je posledica večjega števila lažno negativnih rezultatov pri odraslih kot pri otrocih.

Naše rezultate smo primerjali z rezultati raziskav objavljenih v strokovnih člankih, kjer so avtorji in sodelavci uporabili različne hitre teste. Ti navajajo, da so ti testi slabše občutljivi in dobro specifični. Le malo je takšnih, ki trdijo nasprotno, saj je pri večini občutljivost manjša od 50%, specifičnost pa okoli 100%. (15-18, 24, 25)

Objavljena sta bila tudi dva članka, kjer so med drugimi izvedli tudi imunokromatografski test TRU FLU. (24, 25) Pri prvi raziskavi (24) so testirali 23 vzorcev pacientov, ki so bili pozitivni na influenco A s PCR metodo. Te so testirali z osmimi različnimi hitrimi testi, med katerimi je bil tudi hitri imunokromatografski test TRU FLU. Pri tem sta bila od vseh 23 pozitivna le 2 vzorca z vrednostima Ct 23,84 in 20,78. Občutljivost vseh osmih testov je znašala 26%. (24)

Pri raziskovalnem delu v drugem članku (25) je bilo testiranih 143 vzorcev pacientov, ki so kazali znake podobne obolenju za influenco. Diagnostiki so poleg RT-PCR metode izvedli še dva imunokromatografska hitra testa (eden od teh je bil hitri test TRU FLU) in test direktne imunofluorescence. Od vseh 143 vzorcev jih je bilo 34 pozitivnih pri RT-PCR metodi, pri hitrem imunokromatografskem testu TRU FLU pa 5. Občutljivost tega testa je znašala 9,7%, specifičnost pa 98,2%. (25)

V primerjavi z navedenim je bila občutljivost hitrega imunokromatografskega testa TRU FLU v naši nalogi višja (41,7%) kot v omenjenih dveh člankih (26% in 9,7%). Vendar občutljivost tudi v našem primeru ni primerna. Kljub temu menimo, da metoda ni primerna za rutinsko uporabo v ustanovah, kjer nimajo na voljo bolj občutljivih molekularnih metod, s katerimi bi ponovno testirali vzorce z negativnim rezultatom.

6. SKLEPI

Pri naši raziskavi, kjer smo uporabili enega od hitrih testov (TRU FLU) in ga primerjali z metodo Real time RT-PCR, smo lahko iz rezultatov sklepali, da je test nizko občutljiv in visoko specifičen. To pomeni, da s hitrim testom ne zajamemo vseh pozitivnih, kadar pa vzorcu določimo pozitiven rezultat, je ta pravilen. Na podlagi primerjalne metode (Real time RT-PCR) smo ugotovili, da je intenziteta obarvanja testnega traku pri hitrem testu odvisna od vsebnosti količine virusa v vzorcu. Zaradi različne intenzitete je odčitavanje rezultatov hitrega testa subjektivno, saj je lahko intenziteta obarvanosti tako šibka, da bi lahko rezultat pomotoma ocenili kot negativnega.

Poleg primerjave hitrega testa z referenčno metodo smo rezultate razdelili in primerjali s skupino otrok in odraslih. Ugotovili smo, da imajo otroci v povprečju večjo vsebnost virusa kot odrasli, kar smo dokazali z vrednostmi Ct, ki so bile pri otrocih manjše kot pri odraslih. Zato lahko predvidevamo, da je vsebnost virusa pri otrocih večja.

Na podlagi zgoraj navedenih ugotovitev lahko sklepamo, da so hitri testi bolj uporabni pri otroški populaciji. Hkrati je treba upoštevati, da negativen rezultat dobljen s hitrim testom še ne pomeni odsotnost virusa influence. V takšnem primeru se priporoča izvedba dodatnih molekularnih metod, ki dajo bolj zanesljive rezultate.

7. LITERATURA

1. Wiedbrauk D, Johnston S. Manual of clinical virology. New York, Raven Press, 1992, 127.
2. Nicholson K, Wood J, Zambon M. Influenza. The Lancet 2003; 362: 1733-45.
3. TRU FLU A rapid immunoassay for the detection of influenza A and influenza B viral antigens in nasal wash, nasopharyngeal aspirate, nasopharyngeal swab and nasal swab samples, Instructions for use. Meridian Bioscience, Inc, Ohio, USA, Rev 11/07, 2007, 1-56.
4. Bouvier N, Palese P. The biology of influenza viruses. Vaccine 2008; 26S: D49-D53.
5. Koren S, Avšič Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M. Splošna medicinska virologija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta – Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2005: 45-47.
6. Influenza virus A and B, A direct immunofluorescence test for the detection of influenza virus A and B, IMAGENTM. Basingstoke, UK, Rev K610511-2, 2009, 1-79.
7. Marolt-Gomišček M, Radšel Medvešček A. Infekcijske bolezni. Ljubljana, Založba Tangram, 2002, 381-386.
8. Osredkar J. Izbrana poglavja iz klinične kemije: učno gradivo za študente farmacije. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, 2008, 306-323.
9. Dwyer E D, Smith W D, Catton G M, Barr G I. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. MJA 2006; 185: S48-S53

10. Persing H D. Molecular microbiology: diagnostic principles and practice. Washington, American society for microbiology, 2004; 48-51, 71-80.

11.

<http://corelabs.cgrb.oregonstate.edu/sites/default/files/Real%20Time%20PCR.From%20Theory%20to%20Practice.pdf>

(dostop 16. 5. 2011)

12. MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija, Rev 03730964001, 1-26.

13.

http://www.cdph.ca.gov/HealthInfo/discond/Documents/Nasopharyngeal_Swab_Collection.pdf

(dostop 11. 10. 2010)

14. <http://www.ucsfhealth.org/adult/adam/data/003746.html>

(dostop 11. 10. 2010)

15. Drexler J F, Helmer A, Kirberg H, Reber U, Panning M, Müller M, Höfling K, Matz B, Drosten C, Eis-Hübinger A M. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. Emerging infectious diseases 2009; 15: 1662-1664.

16. Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (swine) influenza A/H1N1. Clinical infectious diseases 2009; 49: 1090-1093.

17. Kelly K. Correspondence. Clinical infectious diseases 2010; 50: 935-936.

18. Fuenzalida L, Blanco S, Prat C, Vivancos M, Dominguez M J, Modol J M, Rodrigo C, Ausina V. Utility of the rapid antigen detection BinaxNOW Influenza A&B test for detection of novel influenza A (H1N1) virus. Clinical microbiology and infection 2010; 16: 1574-1576.

19. Diallo I S, Hewitson G, Wright L, Rodwell B J, Corney B G. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *Journal of virological methods* 2006; 131: 92-98.

20. Mankoč S, Hostnik P, Grom J, Toplak I, Klobučar I, Kosec M, Barlič-Maganja D. Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: A novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR-ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. *Journal of virological methods* 2007; 146: 341-354.

21.

<http://www.wpro.who.int/internet/resources.ashx/CSR/Publications/GuideforDesigningandConductingInfluenzaStudies.pdf>

(dostop 27. 2. 2011)

22.

<http://www.wpro.who.int/internet/resources.ashx/CSR/Publications/manual+on+animal+ai+diagnosis+and+surveillance.pdf>

(dostop 27. 2. 2011)

23. <http://lgmb.fmrp.usp.br/eg/protocolos/SPOQR.pdf>

(dostop 11. 5. 2011)

24. Herzum I, Lutz T, Koch F, Geisel R, Gehrt A. Diagnostic performance of rapid influenza antigen assays in patients infected with the new influenza A (H1N1) virus. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2010; 48: 53-56.

25. Al Johani S M, Al Balwi M, Al Alwan B, Al Hefdhi R, Hajeer A. Validity of two rapid point of care influenza tests and direct fluorescence assay in comparison of real time PCR for swine of origin influenza virus. *Journal of infection and public health* 2011; 4: 7-11.

- 26.** <http://sharedlab.bme.wisc.edu/2046/equipment/RTPCR/PresenceAbsence.pdf>
(dostop 12. 5. 2011)
- 27.** Steininger C, Redlberger M, Graninger W, Kundi M, Popow-Kraupp T. Near-patient assays for diagnosis of influenza virus infection in adult patients. *Clinical microbiology and infection* 2009; 15: 267-273.
- 28.** Sambol R A, Abdalhamid B, Lyden R E, Aden A T, Noel K R, Hinrichs H S. Use of rapid influenza diagnostic tests under field conditions as a screening tool during an outbreak of the 2009 novel influenza virus: Practical considerations. *Journal of clinical virology* 2010; 47: 229-233.
- 29.** Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang M, Cent A, Corey L, Morrow R. Comparison of Real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44: 2382-2388.
- 30.** http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/em%C5%A1f-Socialna_farmacija/Predavanja/SF6_-_Odlo%C4%8Ditvena_analiza.pdf
(dostop 15. 5. 2011)
- 31.** Di Trani L, Bedini B, Donatelli I, Campitelli L, Chiappini B, De Marco M A, Delogu M, Buonavoglia C, Vaccari G. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infectious Diseases* 2006; 6: 1-8

SLIKE

Slika 1. Prirejena slika po <http://www.virology.ws/2009/06/29/reassortment-of-the-influenza-virus-genome/>
(dostop 16. 5. 2011)

Slika 2. <http://www.stanfordlab.com/esoteric/Virology.html>
(dostop 18. 11. 2010)

Slika 3. Fotografija

Slika 4. Slika prirejena po
<http://www.obgynacademy.com/basicsciences/fetology/genetics/>
(dostop 16. 5. 2011)

Slika 5. Fotografija

Slika 6. Fotografija

PRILOGA 1: Preglednica podatkov in rezultatov vseh pacientov, ki so bili vključeni v diplomsko nalogo.

Spol	Starost	Kužnina	INF A (RT-PCR)	INF A (RT-PCR)-Ct	INF A (Hitri test)
Ž	1	b. NF	poz.	10,22	poz.
Ž	10	b. NF	poz.	16,8	poz.
Ž	0	b. NF	poz.	16,9	poz.
M	5	b. NF	poz.	18,6	rahlo poz.
Ž	21	b. Ž.	poz.	19	rahlo poz.
M	1	b. NF	poz.	19,02	rahlo poz.
Ž	1	b. NF	poz.	19,4	poz.
M	3	b. NF	poz.	19,4	poz.
Ž	33	b. NF	poz.	19,5	poz.
Ž	26	b. NF	poz.	20,5	rahlo poz.
Ž	3	b. NF	poz.	20,7	poz.
Ž	11	b. NF	poz.	21,71	rahlo poz.
M	28	b. NF + b. Ž.	poz.	21,8	zelo rahlo poz.
M	0	b. NF	poz.	21,89	poz.
Ž	1	b. NF	poz.	21,9	rahlo poz.
Ž	8	b. NF	poz.	22,1	poz.
M	19	b. NF + b. Ž.	poz.	22,27	zelo rahlo poz.
Ž	1	b. Ž.	poz.	22,29	neg.
M	3	b. NF	poz.	22,55	neg.
M	3	b. NF	poz.	23,21	zelo rahlo poz.
M	26	b. NF + b. Ž.	poz.	23,5	neg.
M	2	b. NF	poz.	23,83	zelo rahlo poz.
M	0	b. NF	poz.	24,5	neg.
M	1	b. NF	poz.	24,6	zelo rahlo poz.
Ž	1	b. NF	poz.	25,5	neg.
M	30	b. NF + b. Ž.	poz.	25,9	neg.
M	44	b. NF + b. Ž.	poz.	27,4	neg.
Ž	22	b. NF + b. Ž.	poz.	27,6	neg.
M	27	b. NF + b. Ž.	poz.	28,2	neg.
M	2	b. NF	poz.	28,5	neg.
Ž	49	b. NF + b. Ž.	poz.	29,2	neg.
M	0	b. NF	poz.	29,3	neg.
M	3	b. NF	poz.	29,6	neg.
M	51	b. NF + b. Ž.	poz.	29,8	neg.

Kovač U.: Primerjava hitrega antigenega testa z metodo verižne reakcije s polimerazo za določanje virusa influence A

Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

M	3	b. NF	poz.	30,3	neg.
Spol	Starost	Kužnina	INF A (RT-PCR)	INF A (RT-PCR)-Ct	INF A (Hitri test)
Ž	38	b. NF	poz.	30,3	neg.
Ž	51	b. NF	poz.	30,4	neg.
Ž	3	b. NF + b. Ž.	poz.	31,3	neg.
M	50	b. NF	poz.	31,6	neg.
Ž	56	b. NF	poz.	31,6	neg.
Ž	51	b. NF	poz.	32,76	neg.
M	57	b. NF	poz.	33,9	neg.
Ž	6	b. NF	poz.	33,98	neg.
Ž	42	b. NF + b. Ž.	poz.	34,5	neg.
M	49	b. NF	poz.	35,1	neg.
M	9	b. NF	poz.	35,11	neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
M	0	b. NF	neg.		neg.
Ž	0	b. NF	neg.		neg.
Ž	1	b. NF	neg.		neg.
Ž	1	b. NF	neg.		neg.
Ž	1	b. NF	neg.		neg.
Ž	1	b. NF	neg.		neg.
Ž	1	b. NF	neg.		neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
Ž	1	b. NF	neg.		neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
M	1	b. NF	neg.		neg.
Ž	1	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	2	b. NF	neg.		neg.
M	2	b. NF	neg.		neg.
Ž	2	b. NF	neg.		neg.
Ž	2	b. NF	neg.		neg.
M	2	b. NF	neg.		neg.
Ž	3	b. NF	neg.		neg.
M	4	b. NF	neg.		neg.
Ž	5	b. NF	neg.		neg.
M	6	b. NF	neg.		neg.
M	7	b. NF	neg.		neg.
M	7	b. NF	neg.		neg.

Kovač U.: Primerjava hitrega antigenskega testa z metodo verižne reakcije s polimerazo za določanje virusa influence A

Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Ž	7	b. NF	neg.		neg.
Spol	Starost	Kužnina	INF A (RT-PCR)	INF A (RT-PCR)-Ct	INF A (Hitri test)
Ž	11	b. NF	neg.		neg.
M	12	b. NF	neg.		neg.
M	13	b. NF	neg.		neg.
M	14	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	16	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	17	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	20	b. NF. + b. Ž.	neg.		neg.
M	22	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	22	b. Ž.	neg.		neg.
M	24	b. Ž.	neg.		neg.
Ž	27	b. Ž.	neg.		neg.
M	30	b. NF	neg.		neg.
M	30	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	30	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	31	b. NF	neg.		neg.
Ž	34	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	35	b. NF	neg.		neg.
Ž	35	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	36	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	37	b. NF	neg.		neg.
M	39	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	40	b. NF	neg.		neg.
Ž	40	b. NF	neg.		neg.
Ž	41	b. NF	neg.		neg.
M	41	b. Ž.	neg.		neg.
M	43	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	47	b. NF	neg.		neg.
Ž	47	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	48	b. NF	neg.		neg.
M	53	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	54	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	56	b. NF	neg.		neg.
M	56	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	57	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	58	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	62	b. NF. + b. Ž.	neg.		neg.
M	64	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	66	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	67	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.

Kovač U.: Primerjava hitrega antigeneskega testa z metodo verižne reakcije s polimerazo za določanje virusa influence A

Diplomska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Spol	Starost	Kužnina	INF A (RT-PCR)	INF A (RT-PCR)-Ct	INF A (Hitri test)
Ž	70	b. NF	neg.		neg.
Ž	71	b. NF	neg.		neg.
Ž	72	b. NF	neg.		neg.
Ž	72	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
M	74	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.
Ž	74	b. NF + b. Ž.	neg.		neg.

N = 120

Povprečna starost preiskovancev = 23,5

