

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

IVA KOVAČIČ

**PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DOKAZOVANJE ADENOVIRUSNIH OKUŽB  
DIHAL PRI OTROCIH**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERSITY OF LJUBLJANA

FACULTY OF PHARMACY

IVA KOVAČIČ

**COMPARISON OF TWO METHODS FOR DETECTION OF RESPIRATORY  
ADENOVIRUS INFECTIONS IN CHILDREN**

Ljubljana, 2017

Kovačič I: Primerjava dveh metod za dokazovanje adenovirusnih okužb dihal pri otrocih  
Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, magistrski študij  
Laboratorijske biomedicine, 2017.

---

Magistrska naloga je zaključek univerzitetnega študija laboratorijske biomedicine. Nalogo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom izr. prof. dr. Miroslava Petrovca, dr. med.

#### Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvom prof. dr. Miroslava Petrovca.

Študentkin lastnoročni podpis

## Vsebina

KAZALO.....	II
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
KAZALO ENAČB.....	V
POVZETEK .....	VII
SUMMARY .....	VIII
KLJUČNE BESEDE .....	IX
KEY WORDS .....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV.....	X
1 UVOD .....	1
1.1 ADENOVIRUSI .....	1
1.1.1 Taksonomska uvrstitev .....	1
1.1.2 Morfologija in zgradba.....	2
1.1.3 Patogeneza .....	3
1.1.4 Epidemiološke značilnosti .....	3
1.1.5 Klinična slika .....	4
1.1.6 Zdravljenje .....	4
1.2 ADENOVIRUSNE OKUŽBE PRI OTROCIH .....	5
1.3 ADENOVIRUSI IN SOČASNE OKUŽBE Z DRUGIMI VIRUSI IN BAKTERIJAMI..	5
1.4 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA .....	6
1.4.1 Neposredna imunofluorescanca (DIF) .....	7
1.4.2 Osamitev nukleinskih kislin .....	8
1.4.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	8
1.5 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST DIAGNOSTIČNIH METOD .....	8
1.6 STUDENTOV t-TEST .....	10
2 NAMEN DELA .....	10

<b>3 MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 MATERIAL.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.1 Klinični vzorci.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2 Priprava vzorcev .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 METODE DELA.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.1 Neposredna imunofluorescencija (DIF) .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2 Osamitev nukleinskih kislin.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) .....</b>	<b>16</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 VZORCI.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 REZULTATI TESTIRANJ .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1 Neposredna imunofluorescencija (DIF) .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 PRIMERJAVA METOD.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.1 Občutljivost metode DIF .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.2 Specifičnost metode DIF .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5 VREDNOSTI Ct.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5.1 Studentov t-test za primerjavo neodvisnih vzorcev.....</b>	<b>32</b>
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	<b>34</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>37</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>40</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba adenovirusa. V sredici je vidna virusna DNA. Na sliki so označeni nitasti izrastki, s katerimi se virus pripne na celico ter virusni proteini pentoni in heksoni.....	2
<b>Slika 2:</b> Nastanek kompleksa med antigenom in s fluoroforom označenim specifičnim protitelesom .....	13
<b>Slika 3:</b> Shematski prikaz posameznih faz osamitve nukleinskih kislin. Dodana proteinaza K in razgradnji pufer povzročita lizo celic in sproščanje nukleinskih kislin. Sledi vezava NK na magnetne delce, s čimer jih ločimo od raztopine. Z več zaporednimi spiranji odstranimo večino celičnega ostanka, nato pa ponovimo postopek magnetnega ločevanja. Na koncu nukleinske kisline speremo s steklenih magnetnih delcev s pomočjo pufra za spiranje pri visoki temperaturi. ....	15
<b>Slika 4:</b> Grafični prikaz faz metode PCR. V eksponentni fazi število pridelkov eksponentno narašča, količina reagentov pa je neomejena. V linearni fazi zaradi že porabljenih reagentov število pridelkov narašča linearno, v zadnji fazi platoja pa količina pridelkov zaradi porabljenih reagentov ostaja nespremenjena.....	18
<b>Slika 5:</b> Postopek pomnoževanja DNA z metodo PCR, kjer v prvem koraku potečeta denaturacija in razpiranje verige DNA, sledi prileganje oligonukleotidnih začetnikov, na koncu pa se cikel zaključi s podaljševanjem novonastale verige. Iz ene molekule DNA dobimo ob koncu prvega cikla dve molekuli pridelka. Skozi vse nadaljnje cikle reakcije pa število pridelkov eksponentno narašča, vse dokler se ne porabijo reagenti.....	19
<b>Slika 6:</b> Porazdelitev vzorcev glede na spol.....	25
<b>Slika 7:</b> Številčna porazdelitev vzorcev glede na starost bolnikov.....	26
<b>Slika 8:</b> Porazdelitev vzorcev glede na vrsto vzorca.....	26
<b>Slika 9:</b> Porazdelitev pozitivnih rezultatov določenih z metodo qPCR glede na starost bolnikov. ....	28
<b>Slika 10:</b> Okvirja z ročaji, ki prikazujeta mediani vrednosti Ct pozitivnih vzorcev potrjenih z obema metodama (levo) in negativnih vzorcev, določenih z metodo DIF, ki smo jih kasneje z metodo qPCR določili kot pozitivne (desno). Prikazani sta najmanjši in največji vrednosti, mediani ter 1. in 3. kvartil.....	31

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Kontingenčna tabela 2x2 resnično pozitivnih, lažno pozitivnih, lažno negativnih in resnično negativnih rezultatov pridobljenih z metodama DIF in qPCR, s katerimi smo izračunali občutljivost in specifičnost metode neposredne imunofluorescence (DIF).....	9
<b>Preglednica II:</b> Reagenti prisotni v reakcijski mešanici qPCR in njihove količine.....	23
<b>Preglednica III:</b> Temperaturni cikli komercialno dostopne reakcijske mešanice za namen qPCR .....	24
<b>Preglednica IV:</b> Število pozitivnih in negativnih rezultatov določenih z metodo neposredne imunofluorescence (DIF). ....	27
<b>Preglednica V:</b> Število pozitivnih in negativnih rezultatov določenih z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).....	27
<b>Preglednica VI:</b> Kontingenčna tabela 2x2, ki prikazuje števila resnično pozitivnih, lažno pozitivnih, lažno negativnih in resnično negativnih rezultatov pridobljenih z metodama DIF in qPCR, s katerimi smo nato izračunali občutljivost in specifičnost metode DIF.....	29
<b>Preglednica VII:</b> Kontingenčna tabela 2x2, ki prikazuje števila resnično pozitivnih, lažno pozitivnih, lažno negativnih in resnično negativnih rezultatov pridobljenih z metodama DIF in qPCR, s katerimi smo nato izračunali občutljivost in specifičnost metode DIF.....	30
<b>Preglednica VIII:</b> Pregled osnovnih značilnosti vrednosti Ct vzorcev, ki so bili pozitivni z obema metodama (DIF in qPCR) in vzorcih, negativnih z metodo DIF, a pozitivnih z metodo qPCR.....	32
<b>Preglednica IX:</b> Vrednosti parametrov Studentovega t-testa za primerjavo neodvisnih vzorcev.....	33

## KAZALO ENAČB

<b>Enačba 1:</b> Enačba za izračun občutljivosti testa. V enačbi uporabimo številčne vrednosti resnično pozitivnih in lažno negativnih rezultatov dobljenih pri primerjavi metode DIF z metodo qPCR.....	9
<b>Enačba 2:</b> Enačba za izračun specifičnosti testa. V enačbi uporabimo številčne vrednosti resnično negativnih in lažno pozitivnih rezultatov dobljenih pri primerjavi metode DIF z metodo qPCR.....	9
<b>Enačba 3:</b> Enačbi za testiranje hipotez $H_0$ in $H_1$ .....	10

## POVZETEK

Adenovirusi so pogosti povzročitelji bolezni dihal pri otrocih, v državah tretjega sveta pa so okužbe z določenimi serotipi lahko celo življenjsko ogrožajoče. V okviru magistrske naloge smo žeeli ugotoviti kolikšno število vzorcev, ki so bili v okviru rutinske diagnostike z metodo neposredne imunofluorescence (DIF) negativni, bo, pri ponovnem testiranju z občutljivejšo metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR), pozitivnih. Testirali smo 740 vzorcev, ki smo jih, v časovnem razponu od 09.04.2011 do 13.03.2014, v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) prejeli s Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (Univerzitetni klinični center Ljubljana). Najpogosteje testirani vzorci so bili brisi žrela, največje število vzorcev pa je pripadalo bolnikom do prvega leta starosti, pri katerih so sumili na adenovirusno okužbo. Kar 593 (80 %) vseh vzorcev je pripadalo otrokom mlajšim od treh let. Iz vzorcev smo osamili virusno nukleinsko kislino in jo pomnožili s qPCR. Tako smo dokazali 120 (16,2 %) več pozitivnih in 9 (1,2 %) več negativnih rezultatov, ki so jih z metodo DIF predhodno opredelili kot pozitivne. Ker je številčno največ vzorcev pripadalo bolnikom do prvega leta starosti, smo med njimi pričakovano dobili največ qPCR pozitivnih rezultatov. Določili smo tudi občutljivost in specifičnost metode DIF in ugotovili, da je bila občutljivost metode DIF 64 % in specifičnost 98 %. V nadaljevanju smo pri 210 (28,4 %) pozitivnih rezultatih, ki smo jih potrdili z obema metodama, dobili povprečno vrednost praga fluorescence  $C_t = 20,2$ , pri preostalih 120 (16,2 %) vzorcih, ki so bili pozitivni samo z metodo qPCR, pa je bila povprečna vrednost  $C_t = 29,6$ . S primerjanjem vrednosti  $C_t$  smo ocenili, da je virusno breme višje v vzorcih, ki so jih kot pozitivne opredelili tudi z rutinsko diagnostično metodo DIF. Na podlagi izsledkov naše raziskave sklepamo, da je metoda PCR v realnem času občutljivejša od rutinsko izvajane metode DIF. S Studentovim t-testom za primerjavo neodvisnih vzorcev smo sprejeli alternativno hipotezo ( $p < 0,05$ ) s katero smo trdili, da obstaja statistično značilna razlika med vrednostmi  $C_t$  vzorcev, ki smo jih opredelili kot pozitivne z obema metodama in vrednostmi  $C_t$  tistih, ki so bili z metodo DIF negativni, z metodo qPCR pa pozitivni.

## SUMMARY

Adenoviruses are a common cause of respiratory infections in children, and in the third world countries, infections with certain serotypes may even be life-threatening. In our master thesis, we tried to determine how many samples negative by routine diagnostic method of direct immunofluorescence (DIF) proved positive in a re-testing with a more sensitive method of real-time polymerase chain reaction (qPCR). We tested 740 samples that were sent to the Laboratory for diagnostic of viral infections (Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana) in the period from April 9, 2011 to March 13, 2014, from the Clinic for Infectious Diseases and Febrile Illnesses (Ljubljana University Medical Centre). The most commonly tested samples were throat swabs with the largest number of them belonging to children up to the age of one year, who were suspected to have adenoviral infections. 593 (80%) of all samples belonged to children under three years of age. We isolated viral nucleic acids from the samples and quantified them by qPCR. By using qPCR, we got 120 (16.2%) more positive and 9 (1.2%) more negative results that were previously identified as such by DIF method. While most of the samples were from the patients up to the age of one, we expectedly got most of the qPCR positive results within this age group. We have also determined sensitivity and specificity of the DIF method. The sensitivity of the DIF method was 64%, and specificity 98%. Additionally, in 210 (28.4%) positive results, which were confirmed by both methods, the average threshold cycle (C<sub>t</sub>) value was 20.2 C<sub>t</sub>, while in the remaining 120 (16.2%) samples, that proved positive only by the qPCR method, the average C<sub>t</sub> value was 29.6. By comparing the C<sub>t</sub> values, we found that the viral load was the highest in samples defined as positive by both methods. Based on the findings of our study we can conclude that the real-time PCR method is more sensitive than the routinely performed DIF method. Finally by using the Student's t-test for independent samples, the alternative hypothesis ( $p < 0.05$ ) stating that there is a statistically significant difference between the C<sub>t</sub> values samples identified as positive by both methods and those pertaining to samples which were negative by DIF method, but found to be positive by the qPCR method.

Kovačič I: Primerjava dveh metod za dokazovanje adenovirusnih okužb dihal pri otrocih  
Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, magistrski študij  
Laboratorijske biomedicine, 2017.

---

## **KLJUČNE BESEDE**

Neposredna imunofluorescenza, verižna reakcija s polimerazo v realnem času, adenovirus, respiratorne okužbe, otroci do 15. leta.

## **KEY WORDS**

Direct immunofluorescence, real time polymerase chain reaction, adenovirus, respiratory infections, children under age of 15.

---

## SEZNAM OKRAJŠAV

OKRAJŠAVA	OBRAZLOŽITEV
AdF	Pozitivno usmerjen oligonukleotidni začetnik (angl. <i>Forward primer</i> )
AdR	Negativno usmerjen oligonukleotidni začetnik (angl. <i>Reverse primer</i> )
AdV	Adenovirus
BEBO	Nesimetrično barvilo
BHQ	Dušilec (angl. <i>Black hole quencher</i> )
BLAST	Iskalnik homolognih sekvec (angl. <i>Basic local alignment search tool</i> )
C	Citozin
CAR	Coxsackie – adenovirusni receptor (angl. <i>Coxsackie-adenovirus receptor</i> )
Ct	Prag fluorescence (angl. <i>Threshold cycle</i> )
DABCYL	Dušilec (4,4 – dimetilamino – azobenzenen – 4' – karboksilna kislina)
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksicitozin trifosfat
ddH2O	Demineralizirana destilirana voda
dGTP	Deoksigvanozin trifosfat
DIF	Neposredna imunofluorescencija (angl. <i>Direct immunofluorescence</i> )
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Deoksinukleozid trifosfat
dsDNA	Dvojnovijačna DNA
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EAV	Virus konjskega arteritisa (angl. <i>Equine artheritis virus</i> )
EHV1	Konjski herpesvirus tipa 1 (angl. <i>Equine herpesvirus type 1</i> )
FAM	Reportersko fluorescentno barvilo

FRET	Prenos resonančne energije (angl. <i>Fluorescence resonance energy transfer</i> )
G	Gvanin
IgG	Imunoglobulini razreda G
IgM	Imunoglobulini razreda M
iPCR	Imunska verižna reakcija s polimerazo v realnem času
Kbp	Enota za dolžino DNA (tisoč baznih parov)
LN	Lažno negativen rezultat
LP	Lažno pozitiven rezultat
MDa	Mega dalton
NCBI	Podatkovna zbirka biomedicinskih in genomskeh informacij (angl. <i>National center for biotechnology information</i> )
PBS	Fosfatni pufer s soljo
Primer 3	Računalniški program za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov
qPCR	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RN	Resnično negativen rezultat
RP	Resnično pozitiven rezultat
RTPrimerDB	Javna podatkovna baza oligonukleotidnih začetnikov in sond za PCR
SYBR Green 1	Nesimetrično barvilo
TAMRA	Rdeče fluorescentno barvilo (karboksi – tetrametil – rodamin)
Taq	Bakterija <i>Thermus aquaticus</i>
TaqMan	Sonda TaqMan
Tm Calculator	Internetno dostopno računalo, ki omogoča izračun temperature tališč oligonukleotidov
VIC	Reportersko fluorescentno barvilo
VIN	Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta v Ljubljani
YO-PRO-1	Zeleno fluorescentno barvilo

## 1 UVOD

### 1.1 ADENOVIRUSI

Adenovirusi so prisotni pri skoraj vseh vretenčarjih. Pri človeku jih najpogosteje povezujemo z boleznimi zgornjih dihal, na primer vnetjem žrela, povzročajo pa lahko tudi pljučnice. Manj pogosto so adenovirusi znani kot povzročitelji obolenj prebavil, oči, sečil in živčevja, omenjajo pa jih tudi kot možne povzročitelje debelosti (1). Večina adenovirusnih okužb je samoomejujočih. Hudi zapleti se najpogosteje pojavijo pri imunsko oslabljenih bolnikih, občasni smrtni primeri pa so znani tudi pri zdravih otrocih in odraslih (2).

Adenovirusi so sposobni okužiti številna različna tkiva in celice. Zaradi razmeroma enostavnega ravnanja *in vitro* številne študije preučujejo adenoviruse kot vektorje za namene genskega zdravljenja in za namene protitumorske imunizacije, uporabni pa so tudi kot eksperimentalni sistemi za preučevanje osnovnih procesov v evkariontskih celicah (apoptoza) (3, 4).

#### 1.1.1 Taksonomska uvrstitev

Adenovirusi spadajo v družino *Adenoviridae*, ki je razdeljena v 5 rodov:

- *Mastadenovirus*,
- *Aviadenovirus*,
- *Atadenovirus*,
- *Siadenovirus*,
- *Ichtadenovirus*.

V rod *Mastadenovirus* spada 7 vrst človeških adenovirusov. Glede na biološke, biokemične in imunološke značilnosti jih delimo v vrste od A do G, največ pa jih sodi v vrsto D (HAdV-D). Trenutno je znanih več kot 67 adenovirusnih serotipov, kar tretjina od teh jih pri človeku povzroča bolezen (1, 5). Adenovirusi so najpogostejši povzročitelji virusnih okužb. Virus so

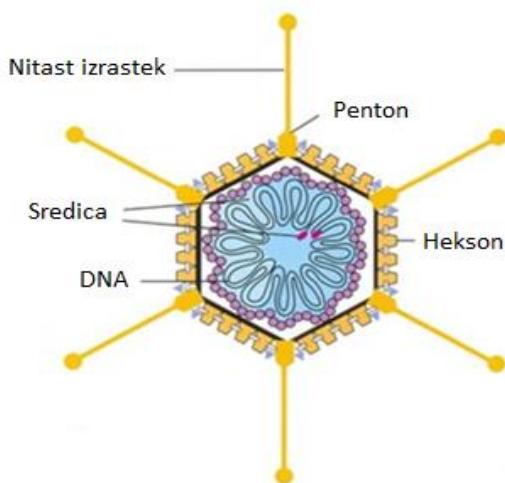
---

prvič osamili leta 1953 iz adenoidnega tkiva, do danes pa so ga našli praktično že v vseh organskih sistemih človeka (6).

### 1.1.2 Morfologija in zgradba

Adenovirusi vsebujejo linearno dvojnogijačno DNA, veliko od 26 do 45 kbp, ki ima zapis za 13 proteinov: heksonski monomer, pentonsko bazo, polipeptid IIIa, polipeptid IV, polipeptid VI, polipeptid VIII, polipeptid IX, proteazo, TP (končni protein) ter proteine sredice (V, VII, Mu in IV2a) (7). Slika 1 prikazuje virusno ikozaedrično kapsido, ki je srednje velikosti, s premerom med 70 in 90 nm, brez zunanjega lipidnega ovoja, zaradi katerega so adenovirusi v okolju dobro obstojni. Kapsido sestavlja 252 kapsomer, in sicer 240 heksonov in 12 pentonov. Adenovirusi se pritrjujejo na celice s pomočjo pentomernih nitastih izrastkov različnih dolžin, odvisno od posameznega virusnega tipa. Zgrajeni so iz približno milijona aminokislin, njihova masa pa je 150 MDa (5).

Adenovirusni genom je linearna, nesegmentirana dvojnogijačna DNA dolžine med 26 in 45 kbp, kar ji omogoča kodiranje od 22 do 40 genov. Kljub precejšnji velikosti virusa je njegovo podvajanje v celoti odvisno od gostiteljske celice (5).



**Slika 1:** Zgradba adenovirusa. V sredici je vidna virusna DNA. Na sliki so označeni nitasti izrastki, s katerimi se virus pripne na celico ter virusni proteini pentoni in heksoni. Pritejeno po (8).

### 1.1.3 Patogeneza

Adenovirusi povzročajo okužbe zgornjih in spodnjih dihal, očesnih veznic in sečil ter vnetje prebavil, medtem ko osrednje živčevje prizadenejo le izjemoma. Dobro se razmnožujejo le v celicah epiteljskega izvora. Te okužijo preko receptorja CAR (angl. *coxsackie-adenovirus receptor*) na katerega se pripnejo z nitastimi izrastki. Prehod virusa skozi celično membrano poteka s pomočjo vezave pentonov na celične integrine in druge receptorje, ki sodelujejo pri fagocitozi. Oblikuje se fagocitogni vezikel, ki se sprosti v citoplazmo. V veziklu virus razpade, sredica z virusno DNA pa preko jadrne membrane preide v celično jedro, kjer se usmeri proti kromatinu. Virusna DNA se nato pomnožuje skupaj s celičnim genetskim materialom (9).

Regionalne bezgavke ponavadi zamejijo okužbo, vendar pa lahko adenovirusi vrste C v stanju latentne okužbe v žrelnici in tonsilah preživijo več let in se v blato izločajo še več mesecev po začetni okužbi (10).

### 1.1.4 Epidemiološke značilnosti

Adenovirusi so razširjeni povsod po svetu in so odporni na različne kemijske in fizikalne dejavnike. Za okužbe z njimi je značilno, da se pojavljajo skozi celo leto, občasno ali celo endemično. Prenos virusa poteka kapljično, preko fekalno–oralne poti ali izbljuvkov. Inkubacijska doba pri okužbah dihal je od 2 do 6 dni, pri okužbah prebavil od 7 do 8 dni, pri okužbah oči pa od 8 do 10 dni. Izločanje virusov je pri različnih okužbah možno tudi do 6 tednov, imunsko oslabljeni bolniki pa lahko adenoviruse izločajo tudi do 12 mesecev po okužbi. Pri bolnikih s pljučnico, gastroenteritisom in tistih z očesnimi okužbami je možnost prenosa virusa večja (6).

### 1.1.5 Klinična slika

Približno tretjina znanih človeških serotipov adenovirusov povzroča bolezen. Ponavadi gre le za blage okužbe dihal, prebavil in oči, ki ne zahtevajo posebne medicinske obravnave, večja previdnost pa je potrebna pri imunsko oslabljenih bolnikih in tistih po presaditvi tkiv ali organov (9).

Bolezenski znaki pri okužbi z adenovirusi so lahko zelo podobni tistim, ki so izraženi pri drugih boleznih, na primer bakterijskih okužbah ali Kawasakievi bolezni. Zaradi izbire pravilnega zdravljenja in preprečevanja nepotrebne uporabe antibiotikov, je postavitev pravilne diagnoze zelo pomembna. Ryan in sodelavci navajajo, da sta si okužba z adenovirusi in Kawasakieva bolezen glede na bolezenske značilnosti zelo podobni (11). Za obe patološki stanji so značilni dolgotrajnejša visoka vročina, vnetje žrela, konjunktivitis, povečane vratne bezgavke in izpuščaji. Adenovirusna okužba se od Kawasakieve bolezni razlikuje po bolečem žrelu, rinitisu, enostranskem konjunktivitisu, ki ga spremišča voden izcedek, subkonjuktivalnih krvavitvah in oblikovanju rožnato sive krhke membrane na veznici očesa. Adenovirusni konjunktivitis spremišča srbeč, pekoč občutek tujka v očesu, ki pa ni značilen za Kawasakievu bolezen (11).

Pri vročičnih otrocih, okuženih z adenovirusom, se pogosto pojavi sistemski eritematozni makulopapularni izpuščaj, prav tako pa se lahko pojavi bolečina v desnem predelu trebušne votline (11).

### 1.1.6 Zdravljenje

Človeški adenovirusi lahko povzročajo razširjene okužbe, prav tako so znani tudi smrtni primeri pri imunsko oslabljenih bolnikih, pa tudi pri sicer zdravih otrocih in starejših odraslih. Učinkovitega zdravljenja okužb z adenovirusi ni.

V mnogih transplantacijskih klinikah uporabljajo za zdravljenje adenovirusnih okužb cidofoviro, pri čemer pa še vedno potekajo raziskave njegove učinkovitosti. Cidofoviro je aciklični nukleozidni fosfonat, analog citidin monofosfata, ki ga vbrizgajo intravensko. V

celici predstavlja substrat za adenovirusno polimerazo DNA, kar virusni DNA prepreči nadaljnjo podvojevanje. Težave pri učinkovitem zdravljenju z njim predstavljata njegovi majhna celična absorbcija in nefrotoksičnost (12).

Brincidofovir je derivat cidofovirja, ki se dobro veže na lipide. Predstavlja napredek pri zdravljenju adenovirusnih okužb, saj je primeren za oralno uporabo, lažje prehaja v celice in ni nefrotoksičen. Trenutno je učinkovina v tretji fazi kliničnega preizkušanja (12).

Živo cepivo proti adenovirusnim tipoma HAdV-E4 in HAdV-B7 je v obliki dveh tablet za oralno uporabo od marca leta 2011 ponovno na voljo ameriškemu vojaškemu osebju, v starosti med 17 in 50 let (13).

## 1.2 ADENOVIRUSNE OKUŽBE PRI OTROCIH

Adenovirusi so v 7-8 % povzročitelji bolezni dihal pri otrocih. Povzročajo lahko okužbe zgornjih in spodnjih dihalnih poti, vključno z bronholitismom in pljučnico. Posamezen serotip lahko povzroči različne oblike bolezni, določeno bolezensko stanje pa je lahko odraz prisotnosti več različnih adenovirusnih serotipov (10, 14, 15).

S kliničnega vidika med serotipe, ki povzročajo okužbe spodnjih in zgornjih dihalnih poti, prištevamo serotipe vrste B (HAdV-B3, HAdV-B7), C (HAdV-C1, HAdV-C2, HAdV-C5) in E (HAdV-E7). Serotipi iz vrste F (HAdV-F40 in HAdV-F41) povzročajo gastroenteritis, tisti iz vrste D (HAdV-D8, HAdV-D19 in HAdV-D37) pa najpogosteje okužbe oči (16).

Pri zdravih otrocih je večina adenovirusnih respiratornih okužb blagih in jih brez laboratorijske diagnostike ne moremo razlikovati od drugih tovrstnih virusnih okužb. Serotipi HAdV-B3, HAdV-B7 in HAdV-B14 so znani kot povzročitelji težjih oblik bolezni (17).

### **1.3 ADENOVIRUSI IN SOČASNE OKUŽBE Z DRUGIMI VIRUSI IN BAKTERIJAMI**

Vzroki za okužbe dihal so pogosto tako virusi kot bakterije, ki so sestavni del zgornjih dihalnih poti. Potencialni patogeni so tako del normalne flore, ki so v sinergiji in kompetitivni medvrstni interakciji, vse dokler je prisotno normalno ravnovesje flore. V prisotnosti novega virusa ali bakterije pa se to ravnovesje lahko poruši, kar lahko vodi v bolezen. Adenovirusi so pogosti spremjevalci bakterijskih okužb. Največkrat jih dokažejo skupaj s *S. pneumoniae*, *H. influenzae* in *M. catarrhalis*. Sočasno pa se adenovirusi pojavljajo tudi z drugimi respiratornimi virusi, in sicer najpogosteje z rinovirusom, respiratornim sincicijskim virusom in virusom influence, ki spadajo med najpogosteje dokazane respiratorne viruse pri otrocih (19, 20).

### **1.4 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA**

Pri usmerjenem etiološkem zdravljenju ima zelo pomembno vlogo laboratorijska diagnostika. Adenovirusna pljučnica lahko ima podobno simptomatiko kot pnevmokokna pljučnica, ki jo zdravimo z antibiotiki. V izogib nepotrebni uporabi antibiotikov, ki lahko vodi do razvoja večkratno odpornih bakterij, je tako zelo pomembno, da razlikujemo med okužbo z adenovirusi ali s *Streptococcus pneumoniae*. Slednja je pogosto vzrok sinuzitisa, pljučnice, meningitisa, osteomielitisa, septičnega artritisa, perikarditisa ali peritonitisa (21).

Izziv v diagnostiki predstavlja adenovirusna vrsta C (HAdV-C), ki je v tonsilah in adenoidnem tkivu zdravih otrok brez simptomov bolezni lahko prisotna dalj časa in jo lahko dokažemo le z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Pri tem so značilne visoke vrednosti Ct, ki odražajo nizko virusno breme, zato v takšnih primerih svetujejo sočasno potrjevanje adenovirusne okužbe v celični kulturi. V primeru nepravilne diagnoze je namreč bolni posameznik lahko izpostavljen nevarnosti zaradi nezdravljene bakterijske okužbe, ali pa ogrožen zaradi koronarne anevrizme, ki se lahko pojavi kot posledica nezdravljene Kawasakieve bolezni (10).

V naši raziskavi smo primerjali metodi neposredne imunofluorescence in verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Dokazovanje adenovirusa lahko izvedemo tudi z elektronsko mikroskopijo, encimsko-imunskim testom, aglutinacijo lateksnih delcev, prav tako pa ga lahko osamimo v primerni celični kulturi (22).

Bonot in sodelavci med novejše metode dokazovanja adenovirusnih okužb prištevajo imunsko verižno reakcijo s polimerazo v realnem času ali iPCR. Princip metode temelji na vezavi primarnega protitelesa na DNA. Konjugat primarnega protitelesa in DNA se nato veže na sekundarno protitelo, ki je pritrjeno na dno mikrotitrsko plošče, naslednji korak pa je eksponentno pomnoževanje vezane DNA tekom verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Metoda spada med najbolj občutljive tehnike, saj so v njej združene pozitivne lastnosti visoke specifičnosti protiteles in visoke občutljivosti verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Za iPCR ni potrebna predhodna osamitev nukleinskih kislin, uporabne pa so tudi majhne količine vzorca, torej so vzorci lahko tudi močno redčeni (23).

#### **1.4.1 Neposredna imunofluorescensa (DIF)**

Neposredna imunofluorescensa je pogosto uporabljen laboratorijska metoda, saj je enostavna za izvedbo, prilagodljiva, hitra in cenovno dostopna. Uporablja se tako v rutinske kot tudi raziskovalne namene (24).

Temelji na principu vezave s fluoroforom označenih specifičnih protiteles na določene virusne antigene. Slednje dokazujemo kot skupke fluorescirajočih agregatov virusnih beljakovin v okuženih celicah s fluorescentno mikroskopijo. Prednosti metode DIF so predvsem kratki inkubacijski časi in enostavno označevanje iskanega antiga, jo pa zaradi nizke občutljivosti nadomeščajo novejši testi (25).

### **1.4.2 Osamitev nukleinskih kislin**

Osamitev nukleinskih kislin predstavlja prvi korak v virološki molekularni diagnostiki. Metode PCR ne moremo uporabiti neposredno na neobdelanih vzorcih, saj primesi in inhibitorji (soli, polisaharidi, proteini) preprečujejo pravilno delovanje encimov.

Klasične metode osamitve nukleinskih kislin zaradi dolgotrajnosti, tehnične zapletenosti, številnih centrifugiranj, nizke stopnje čistote in možnosti kontaminacije med procesom, danes nadomeščajo avtomatizirani sistemi za molekularno diagnostiko (26). Tudi mi smo virusne nukleinske kisline osamili s pomočjo zaprtega avtomatiziranega sistema MagNa Pure Compact (Roche Applied Science, Nemčija). Ta omogoča izvedbo osamitve v 30 minutah, in sicer iz do 8 vzorcev hkrati. Celoten sistem je računalniško nadzorovan in ima programirane vse faze osamitve (27).

### **1.4.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)**

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času omogoča na področju molekularne diagnostike hitro in zanesljivo klinično obravnavo vzorca. Zaradi eksponentnega pomnoževanja tarčne sekvene je za to metodo značilna visoka občutljivost, saj lahko v vzorcu zaznamo od 1 do 10 začetnih kopij izhodne nukleinske kisline. Tako lahko dokažemo prisotnost majhnega števila specifičnih kopij nukleinske kisline, ob prisotnosti velikega števila drugih, nespecifičnih nukleinskih kislin (28). V celoti zaprt in avtomatiziran sistem nam omogoča sprotno dokazovanje količine pomnoženega pridelka, kar zelo zmanjša možnost kontaminacije med procesom. Pomembna pridobitev verižne reakcije s polimerazo v realnem času je tudi možnost hitrejše diagnostike zaradi zmanjšanega števila ciklov, nepotrebnosti detekcijskih postopkov po končani reakciji, uporabe fluorogenih sond ter občutljivih metod za dokazovanje pomnožkov PCR (29).

## 1.5 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST DIAGNOSTIČNIH METOD

Občutljivost testa je definirana kot njegova zmogljivost, da z njim pravilno določimo bolezensko stanje, pri čemer je rezultat pozitiven. Specifičnost testa pa je njegova sposobnost, da z njim pravilno določimo zdrave posamezni, pri čemer je rezultat negativen. Obe vrednosti podajamo v odstotkih.

Ker sta nas zanimali tako občutljivost kot specifičnost metode DIF v primerjavi z visoko občutljivo molekularno metodo qPCR, smo za njuno določitev uporabili kontingenčno tabelo 2x2 (Preglednica I) in Enačbi 1 in 2 (30).

**Preglednica I:** Kontingenčna tabela 2x2 resnično pozitivnih, lažno pozitivnih, lažno negativnih in resnično negativnih rezultatov pridobljenih z metodama DIF in qPCR, s katerimi smo izračunali občutljivost in specifičnost metode neposredne imunofluorescence (DIF).

REZULTATI TESTIRANJ Z MOLEKULARNO METODO qPCR		
REZULTATI TESTIRANJ Z RUTINSKO METODO DIF	POZITIVNI	NEGATIVNI
POZITIVNI	RP = resnično pozitivni Bolni: rezultat testa je pozitiven.	LP = lažno pozitivni Zdravi: rezultat testa je pozitiven.
NEGATIVNI	LN = lažno negativni Bolni: rezultat testa je negativen.	RN = resnično negativni Zdravi: rezultat testa je negativen.

$$OBČUTLJIVOST = RP \div (RP + LN)$$

**Enačba 1:** Enačba za izračun občutljivosti testa. V enačbi uporabimo številčne vrednosti resnično pozitivnih in lažno negativnih rezultatov dobljenih pri primerjavi metode DIF z metodo qPCR.

$$SPECIFIČNOST = RN \div (RN + LP)$$

**Enačba 2:** Enačba za izračun specifičnosti testa. V enačbi uporabimo številčne vrednosti resnično negativnih in lažno pozitivnih rezultatov dobljenih pri primerjavi metode DIF z metodo qPCR.

## 1.6 STUDENTOV t-TEST

Studentov t-test je parametričen test za testiranje hipotez, kjer testna statistika sledi Studentovi oziroma t – porazdelitvi, ob predpostavki, da ničelna hipoteza ( $H_0$ ) drži (Enačba 3).

Metoda t-testa predpostavlja normalno porazdelitev in enako varianco obeh primerjanih vzorcev ter neodvisnost oziroma slučajnost zbranih podatkov skupin vzorcev. Načeloma pa nam omogoča testiranje razlik med razmeroma majhnima skupinama rezultatov ( $n < 30$ ).

Normalnost porazdelitve meritev smo najprej preverili s Shapiro-Wilkovim testom. Vrednosti so normalno porazdeljene, kadar s to analizo dobimo vrednost  $p, > 0,05$ , v obratnem primeru  $< 0,05$  pa temu ni tako.

Pri tovrstnem statističnem testiranju moramo določiti stopnjo tveganja  $\alpha$ , ki je najpogosteje 5 % oziroma 0,05. Ta vrednost predstavlja tveganje, da nismo 100 % prepričani v neko trditev, ampak le 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Ničelno hipotezo ( $H_0$ ) zavrnemo in sprejmemo alternativno ( $H_1$ ), kadar je izračunana vrednost p manjša od stopnje tveganja ( $p < 0,05$ ). Takrat pravimo, da je test statistično značilen. Test pa ni statistično značilen takrat, ko je vrednost p večja od stopnje tveganja ( $p > 0,05$ ), kar pomeni, da lahko privzamemo ničelno hipotezo (31).

Postavitev hipotez:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ ; aritmetični sredini primerjanih skupin vzorcev sta enaki.

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ; aritmetični sredini primerjanih skupin vzorcev nista enaki.

**Enačba 3:** Enačbi za testiranje hipotez  $H_0$  in  $H_1$ .

## 2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo primerjali rezultate dokazovanja adenovirusa z rutinsko metodo neposredne imunofluorescence (DIF) in z bolj občutljivo molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) v vzorcih brisov dihal. Ugotavljali bomo število obravnavanih vzorcev glede na spol, starost in vrsto poslane kužnine (bris žrela, bris nosnega dela žrela, bris nebnic in bris žrela, ki je hkrati tudi bris nosnega dela žrela) zaradi suma na adenovirusno okužbo dihal pri otrocih starih od 0 do 15 let. Zaradi različnih principov na katerih temeljita metodi, menimo, da se bodo pojavila neujemanja v pozitivnih in negativnih rezultatih pridobljenih s primerjanima metodama. Preverili bomo, ali bodo morebitna odstopanja značilna za določeno starost bolnikov ali določeno vrsto testiranih vzorcev.

Pričakujemo, da se občutljivost in specifičnost primerjanih metod ne bosta ujemali. Domnevamo, da bomo z občutljivejšo molekularno metodo uspeli dokazati večje število adenovirusnih okužb kot s predhodno uporabljeno metodo DIF, ki temelji na oddani fluorescenci kompleksov med antigenom in nanj vezanih označenih protiteles.

Prav tako pričakujemo, da bomo v vzorcih, v katerih bomo dokazali prisotnost adenovirusa zgolj z metodo PCR v realnem času, določili manjše virusno breme kot v tistih, v katerih bomo prisotnost adenovirusa dokazali z obema metodama. V magistrski nalogi bomo tudi ugotavljali ali se vrednosti Ct, določene pri vzorcih, ki bodo z metodo DIF negativni in nato z metodo qPCR pozitivni ter tiste pri vzorcih, ki bodo pozitivni z obema metodama, statistično značilne ali ne.

## 3 MATERIALI IN METODE DELA

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Klinični vzorci

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) smo v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij testirali 740 vzorcev poslanih s Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (Univerzitetni klinični center Ljubljana), zaradi dokazovanja adenovirusne okužbe s pomočjo rutinsko uporabljene metode DIF. Prejeli smo 297 (40 %) vzorcev bolnic in 443 (60 %) vzorcev bolnikov. Starostni razpon bolnikov, ki so jim poslani vzorci pripadali, je bil od 0 do 15 let. V raziskavo smo vključili vzorce prejete v časovnem obdobju med 09.04.2011 in 13.03.2014. Iz njih smo naknadno osamili nukleinske kisline in nato izvedli testiranje z metodo qPCR.

Med poslanimi vzorci je bilo 681 brisov žrela (92 %), 39 brisov nosnega dela žrela (5,3 %), 18 brisov nebnič (2,5 %) in 2 kombinirana brisa, in sicer hkrati bris ustnega in bris nosnega dela žrela (0,2 %). Vsi vzorci so bili poslani v komercialno dostopnem transportnem gojišču, ki je primerno za dokazovanje virusnih patogenov. Vzorci so bili z metodo DIF obdelani v najkrajšem možnem času po prejemu. Do testiranja so bili shranjeni na + 4 °C, po testiranju pa smo njihove ostanke, do osamitve nukleinskih kislin, shranili pri – 20 °C.

#### 3.1.2 Priprava vzorcev

Vzorce (bris žrela, bris nosnega dela žrela, bris nebnič), poslane v ustreznih transportnih gojiščih (Copan Universal Transport Medium, Italija), smo 10 sekund stresali na stresalniku. Celotno vsebino transportnega gojišča smo nato prelili v velike sterilne epruvete s plastičnimi zamaški in jih 10 minut centrifugirali pri 2000 obratih na minuto, da so se celice posedle na dno. Supernatant smo nato odlili v predhodno pripravljene sterilne vsebnike, ki smo jih shranili na – 20 °C. Celične suspenzije smo dobro premešali in po 12 µl vsake od njih s pipeto

---

nanesli na predhodno z etanolom razmaščena predmetna stekelca z označenimi polji, ki jih uporabljamo za izvedbo testa DIF.

Predhodno stresanje in centrifugiranje vzorcev povzroči lizo manjšega števila celic, kar omogoči sproščanje tarčnih nukleinskih kislin v supernatant. Prav tako ostane po ločbi celic in supernatanta nekaj celic v supernatantu. Tudi te so nato, če so okužene, vir iskanih virusnih nukleinskih kislin. V našem primeru smo za osamitev virusnih nukleinskih kislin, za izvedbo metode qPCR, uporabili supernatante vzorcev, ki smo jih predhodno zamrznili na – 20 °C.

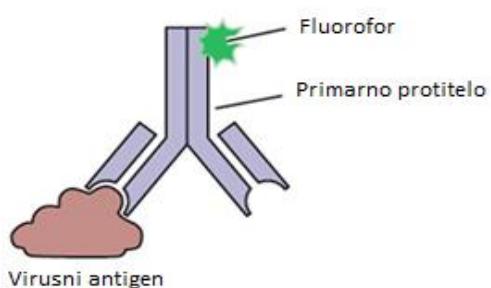
## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Neposredna imunofluorescencija (DIF)

#### 3.2.1.1 Princip metode DIF

Neposredna imunofluorescencija temelji na principu tvorbe imunskega kompleksa med specifičnim antigenom in primarnim monoklonskim protitelesom, na katerega je kemično vezano fluorescentno barvilo (fluorofor). Na Sliki 2 vidimo, da se protitelo veže na specifično mesto (epitop) antiga. S fluorescenčno mikroskopijo vzdražimo fluorofore s svetlobo krajše valovne dolžine, ti pa nato oddajajo svetlobo z daljšo valovno dolžino. Občutljivost metode se giblje med 40 % in 100 %. Velike razlike v občutljivosti so posledice različnih načinov odvzema vzorcev, prisotnosti artefaktov, ki imajo nespecifično imunofluorescenco in subjektivnih ocen oseb, ki izvajajo test (32).

Neposredna imunofluorescencija (DIF)



**Slika 2:** Nastanek kompleksa med antigenom in s fluoroforom označenim specifičnim protitelesom. Prirejeno po (33).

### **3.2.1.2 Uporabljeni aparati in reagenti**

Za izvedbo DIF smo uporabljali predmetna stekelca z 10 označenimi polji (bioMérieux, Francija). V postopku smo uporabili fiziološko raztopino s fosfatnim pufom (PBS) in komercialno dostopna specifična protitelesa IMAGENT™ Adenovirus (Thermo Scientific, ZDA), ki se vežejo na heksonske proteine, značilne za vse serotipe človeških adenovirusov.

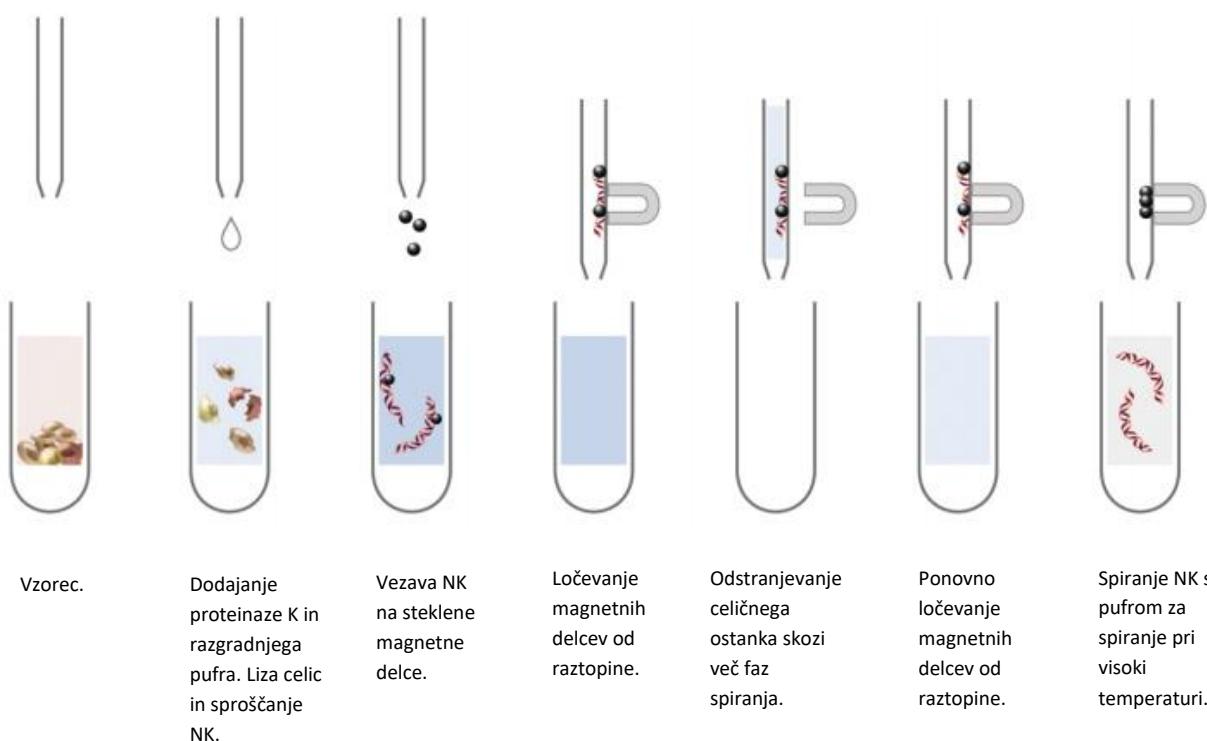
### **3.2.1.3 Protokol metode DIF**

Predmetna stekelca z nanešenim vzorcem kužnine najprej osušimo, nato pa na vzorec nanesemo raztopino specifičnih monoklonskih protiteles in jih v vlažni termostatirani komori inkubiramo 30 minut, na 37 °C. Po inkubaciji stekelca takoj speremo s PBS, spiranje ponovimo še dvakrat z zamikom 5 minut, na koncu pa jih osušimo na sobni temperaturi. Pred mikroskopiranjem na polja s kužnino nanesemo mešanico glicerola in PBS v razmerju 10:1 in predmetna stekelca pokrijemo s krovnimi stekelci.

## **3.2.2 Osamitev nukleinskih kislin**

### **3.2.2.1 Princip osamitve nukleinskih kislin**

Vzorcu dodamo proteinazo K in razgradnji pufer, ki povzročita razpad celic ter s tem sproščanje celične vsebine v okolje. S steklenimi magnetnimi delci in večkratnim spiranjem izvedemo magnetno ločevanje nukleinskih kislin od celičnega ostanka. Zadnjo fazo osamitve predstavlja spiranje nukleinskih kislin s steklenih magnetnih delcev pri visoki temperaturi, s pufom za spiranje (Slika 3).



\*NK = nukleinska kislina

**Slika 3:** Shematski prikaz posameznih faz osamitve nukleinskih kislin. Dodana proteinaza K in razgradnji pufer povzročita lizo celic in sproščanje nukleinskih kislin. Sledi vezava NK na magnetne delce, s čimer jih ločimo od raztopine. Z več zaporednimi spiranji odstranimo večino celičnega ostanka, nato pa ponovimo postopek magnetnega ločevanja. Na koncu nukleinske kislino speremo s steklenih magnetnih delcev s pomočjo pufera za spiranje pri visoki temperaturi. Prirejeno po (34).

### 3.2.2.2 Uporabljeni aparati in reagenti

Za osamitev DNA smo uporabili zaprt avtomatiziran sistem MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science, Nemčija).

Komplet za osamitev nukleinskih kislin MagNA Pure Compact Nucleid Acid Isolation Kit I (Roche Applied Science, Nemčija) vsebuje 32 kartuš s po 12 vdolbinicami, ki vsebujejo različne reagente (proteinazo K, razgradnji pufer, steklene magnetne delce, pufer za spiranje). V pripadajočem kompletu je še 32 plastičnih vložkov z nastavki, 35 epruvetk za vzorce, 35 epruvetk v katerih spiramo osamljene nukleinske kisline in 35 plastičnih pokrovčkov za epruvetke. Aparat lahko naenkrat osami nukleinske kisline iz do 8 vzorcev (35).

### 3.2.2.3 Protokol osamitve nukleinskih kislin

Supernatante vzorcev smo predhodno shranili v zamrzovalni skrinji na – 20 °C. V zaščitni komori z laminarnim pretokom zraka smo jih najprej odmrznili, nato pa jih na električnem stresalniku temeljito premešali. V priložene 1,5 mL epruvetke smo odpipetirali po 5 µl internih kontrol EAV in EHV1 ter po 190 µl posameznega odmrznenega supernatanta.

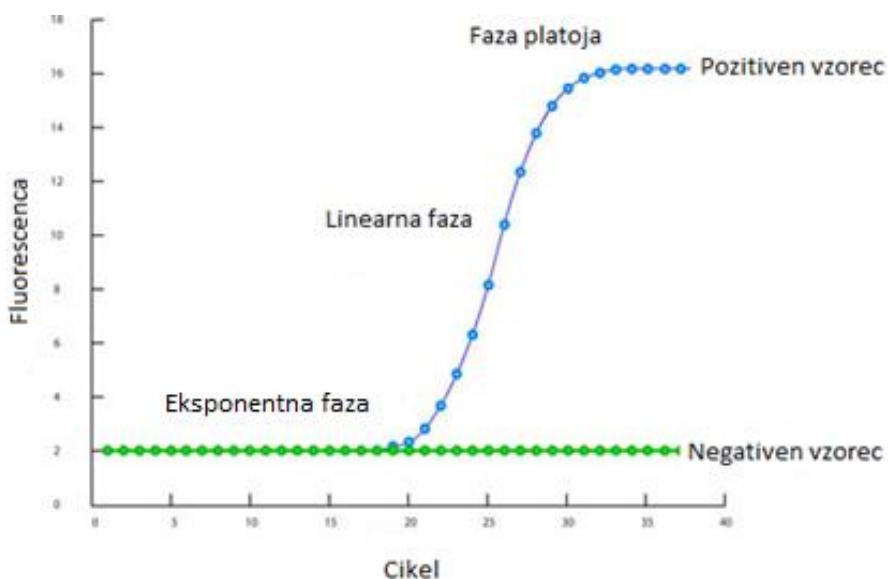
V aparat za osamitev virusnih nukleinskih kislin MagNA Pure Compact Instrument smo vstavili dobro premešane kartuše, vložke z nastavki, epruvetke z vzorci in epruvetke v katerih shranimo osamljene nukleinske kisline. Izbrali smo program DNA\_Blood, ki zahteva 200 µL vzorca, sami pa smo določili 100 µL končnega pridelka. Vnesli smo ustrezne identifikacijske številke vzorcev in začeli postopek osamitve. Ta se je končal po 27 minutah. Epruvetke s pridelkom smo zaprli in jih označili z ustreznimi identifikacijskimi številkami. Če nukleinskih kislin nismo takoj uporabili za izvedbo qPCR, smo jih zamrznili na - 20 °C.

### 3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

#### 3.2.3.1 Princip metode qPCR

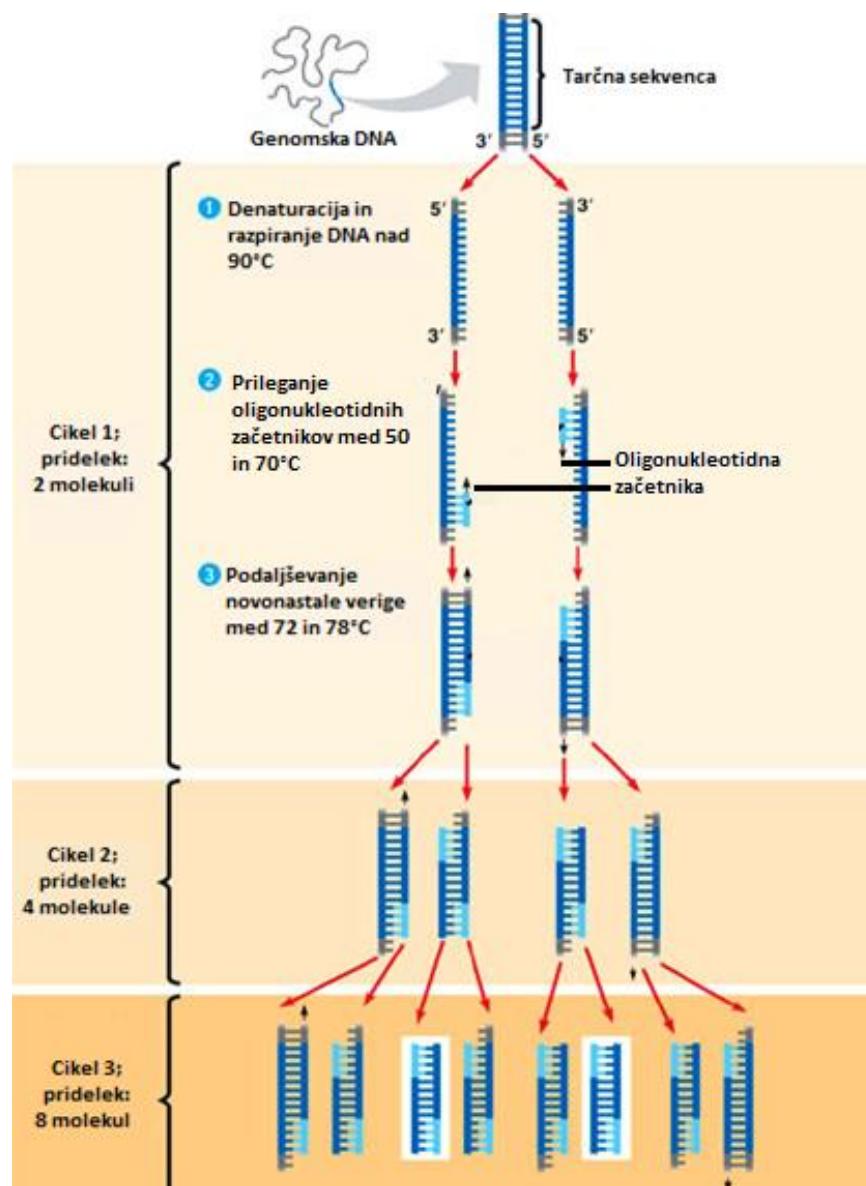
Verižna reakcija s polimerazo v realnem času v osnovi izkorišča pomnoževalno sposobnost polimeraze DNA v prisotnosti kratkih sekvenčno specifičnih sinteznih oligonukleotidnih začetnikov. Najpogosteje uporabljen je temperaturno odporna polimeraza *Taq* DNA, ki so jo osamili iz bakterije *Thermus aquaticus*. Sintezni oligonukleotidi začetniki, ki se vežejo na specifična mesta dvojnovijačne dsDNA, omogočijo, da se iskano tarčno zaporedje v prisotnosti polimeraze eksponentno pomnožuje. Pomembno je, da so začetniki dolgi med 15 in 25 nukleotidi in da vsebujejo od 20 do 70 % delež nukleotidov C in G. Posamezni začetniki naj ne bi vsebovali komplementarnih regij na 3' koncu, poleg tega pa temperaturna razlika v tališčih uporabljenega para oligonukleotidnih začetnikov ne sme biti večja od 5 °C. Pri načrtovanju protokola PCR (oligonukleotidi začetniki, temperatura tališč, tarčno specifične sekvence za prileganje s specifičnim področjem DNA) si lahko pomagamo z internetno dostopnimi programi: BLAST, Primer 3, RTPrimerDB, NCBI in Tm Calculator (36, 37).

Postopek PCR delimo na tri faze: eksponentno, linearno fazo in fazo platoja (Slika 4). Eksponentna faza predstavlja začetni del metode PCR, kjer število pridelkov eksponentno narašča in je količina reagentov neomejena. Računalniški program nam omogoča neprekinjeno spremeljanje količine pridelka, ki se izriše v obliki sigmoidne krivulje. Na začetku reakcije je spremeljanje onemogočeno, saj fluorescentni signal fluorofora ne presega fluorescence ozadja. Možno je šele potem, ko fluorescenza pridelka preseže detekcijski prag ali točko Ct. Vrednost Ct je obratno sorazmerna količini tarčne nukleinske kisline v vzorcu, kar pomeni, da nižja kot je, večja je količina tarčnega analita v vzorcu. V linearni fazi se količina pridelkov linearno povečuje, saj se določena količina reagentov (dNTP, oligonukleotidni začetniki, sonde) že porabi v eksponentni fazi. Reakcija PCR v kasnejših ciklih doseže fazo platoja, kjer količina pridelkov ostaja nespremenjena, pri čemer se porabijo še preostali reagenti, aktivnost polimeraze DNA pa se zmanjša. Za metodo je tudi značilno, da je v idealnih pogojih količina pridelkov PCR v eksponentni fazi sorazmerna količini tarčnega zaporedja na začetku. V primeru 100 % učinkovitosti bi to pomenilo, da se v eksponentni fazi v vsakem ciklu količina pridelkov podvoji (38).



**Slika 4:** Grafični prikaz faz metode PCR. V eksponentni fazi število pridelkov eksponentno narašča, količina reagentov pa je neomejena. V linearni fazi zaradi že porabljenih reagentov število pridelkov narašča linearno, v zadnji fazi platoja pa količina pridelkov zaradi porabljenih reagentov ostaja nespremenjena. Pritejeno po (39).

Metoda qPCR omogoča neprekinjeno merjenje količine pridelka med potekom pomnoževanja. Pomnoževanje in dokazovanje s pomočjo fluorescence tako potekata sočasno, znotraj vsakega cikla. V sklopu ene reakcije PCR se ponavadi zvrsti od 30 do 40 temperturnih ciklov. Posamezen cikel reakcije je temperaturno pogojen, kot sledi: denaturacija in razpiranje dvojnovidne DNA pri temperaturi nad 90 °C, vezava oligonukleotidnih začetnikov med 50 in 75 °C ter podaljševanje novonastale verige DNA pri temperaturi med 72 in 78 °C (38).



**Slika 5:** Postopek pomnoževanja DNA z metodo PCR, kjer v prvem koraku potečeta denaturacija in razpiranje verige DNA, sledi prileganje oligonukleotidnih začetnikov, na koncu pa se cikel zaključi s podaljševanjem novonastale verige. Iz ene molekule DNA dobimo ob koncu prvega cikla dve molekuli pridelka. Skozi vse nadaljnje cikle reakcije pa število pridelkov eksponentno narašča, vse dokler se ne porabijo reagenti. Prirejeno po (40).

Za neprekinjeno dokazovanje pomnoženih produktov lahko uporabimo nespecifične ali specifične metode.

### **1. Nespecifične metode dokazovanja temeljijo na vezavi barvila v dvojnovijačno DNA:**

Pri tem enostavnejšem pristopu uporabljam naslednja barvila: etidijev bromid, YO-PRO-1, SYBR Green 1 in BEBO. Ta se nespecifično vežejo v katerokoli molekulo dsDNA in nato po osvetlitvi s svetlobo določenih valovnih dolžin oddajajo svetlobo daljših valovnih dolžin, ki jo zaznamo. V fazi prileganja oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanja verig se v novonastalo verigo DNA veže velika količina barvila, kar predstavlja maksimalno oddajanje fluorescence, v fazi denaturacije pa se barvilo sprosti v raztopino, kar zaznamo kot močan upad fluorescence. Jakost nespecifičnega fluorescenčnega signala je sorazmerna s količino dsDNA v vzorcu, kar pomeni, da več kot je dsDNA in nanjo vezanih molekul barvila, močnejši je signal. Postopek nespecifičnega dokazovanja pomnoženih pridelkov je manj zahteven in cenejši. Poleg tega na intenziteto signalov in kvantifikacijo rezultatov ne vplivajo mutacije znotraj sekvenc, prav tako pa težav ne povzročajo različni vzorci in različne tarčne molekule. Težave pri interpretaciji rezultatov se lahko pojavijo le zaradi morebitne nespecifične vezave barvila v dimere oligonukleotidnih začetnikov ali v kakšen drug nespecifično pomnožen produkt (36).

### **2. Specifične metode dokazovanja temeljijo na uporabi tarčno specifičnih sond:**

Hidrolizirajoče sonde, ki jih poznamo pod imenom TaqMan oziroma 5' nukleazne sonde, so tarčno specifični oligonukleotidi, ki se vežejo na verigo začetnih oligonukleotidov. Hidrolizirajoče sonde so dvojno označene, in sicer s fluorescentnim reporterskim barvilm (FAM ali VIC), ki je kovalentno vezano na 5' konec, in dušilcem (TAMRA, DABCYL ali BHQ), ki je kovalentno vezan na 3' konec. Ko je molekula reporterskega barvila vezana na 5' konec in jo spodbudimo s svetlobo določene valovne dolžine, začne oddajati svetlobo daljše valovne dolžine. To nato absorbira dušilec, vezan na 3' konec, ki na koncu prejeto energijo odda v obliki topote. Ta fizikalni princip je poznан kot prenos resonančne energije ali FRET in učinkovito deluje le na kratkih razdaljah. V procesu prileganja oligonukleotinovih začetnikov in podaljševanja verig s pomočjo polimeraze DNA, se reportersko barvilo in dušilec ločita zaradi 5' eksonukleazne aktivnosti encima. Dušilec tako ne more več absorbirati oddajajoče fluorescene reporterskega barvila, kar zaznamo v obliki povečanja fluorescence. Linearna

povezanost med številom sproščenih reporterskih molekul in pridelki, nastalimi znotraj vsakega cikla, predstavlja osnovo za izračun začetnega števila kopij tarčnega zapisa (36).

Hibridizacijski označevalci temeljijo na uporabi dveh kratkih oligonukleotidnih začetnikov z vezanima sondama, ki se vežeta drug poleg drugega na izbrano sekvenco. Oligonukleotidni začetnik z donorsko sondijo je vezan na 3' konec in je označen s fluorescinom, ki oddaja zeleno svetlobo, oligonukleotidni začetnik z akceptorsko sondijo pa na 5' konec in je označen z LC rdečim 640 ali LC rdečim 705 in oddaja rdečo svetlobo. Oligonukleotidna začetnika sta zasnovana tako, da se v fazi podaljševanja vežeta na isto verigo v razdalji od 1 do 5 nukleotidov. Donorska sonda potem, ko jo spodbudimo s svetlobo primerne valovne dolžine, oddaja fluorescenco. V primeru, da sta obe sondi vezani na isto tarčno sekvenco, poteče prenos oddajajoče fluorescenčne energije od donorske do akceptorske sonde po principu FRET. Vzbujeni fluorofor odda fluorescentni signal, ki ga zaznamo in izmerimo na koncu vsake faze podaljševanja. Po fazi podaljševanja ponovno nastopi faza denaturacije, v kateri se sondi odcepita od tarčnega zaporedja. V raztopini tako sondi nista dovolj skupaj, da bi lahko prišlo do prenosa resonančne energije. Količina oddane rdeče fluorescence znotraj vsake faze prileganja je sorazmerna količini pomnožkov PCR (36).

### **3. Molekularni oddajniki:**

Molekularni oddajniki so kratka zaporedja DNA, dolga od 5 do 7 nukleotidov, ki zaradi komplementarnosti na 5' in 3' koncih tvorijo zanko. Na 5' koncu zaporedja je vezana sonda z reporterskim barvilm, ki oddaja fluorescenco, na 3' koncu zaporedja pa je vezan dušilec (večinoma DABCYL), ki oddano fluorescenco absorbira. Ob vezavi zanke na komplementarni del verige DNA pride do razmaknitve med reporterskim barvilm in dušilcem, kar omogoči oddajanje fluorescence reporterskega barvila. Oddano fluorescenco tako zaznamo in izmerimo po vsaki fazi prileganja (36).

Med novejše tarčno specifične sonde namenjene dokazovanju produktov PCR spadajo: sonde PNA, sonde MGB, oligonukleotidni začetniki in sonde LNA, oligonukleotidni začetniki »Scorpion«, oligonukleotidni začetniki LUX in drugi (36).

Podatke, pridobljene z metodo PCR v realnem času, lahko kvantificiramo absolutno ali relativno. Za absolutno kvantifikacijo potrebujemo interno ali eksterno kalibracijsko krivuljo,

s pomočjo katerih lahko določimo začetno število tarčnih zaporedij, relativna kvantifikacija pa nam omogoča primerjavo izražanja tarčnega zaporedja z referenčnim oziroma primerjavo izražanja tarčnega gena v preiskovanem vzorcu z izražanjem enakega gena v referenčnem vzorcu (41).

### 3.2.3.2 Uporabljeni aparati in reagenti

Za dokazovanje adenovirusne DNA smo uporabili zaprt avtomatiziran sistem za pomnoževanje StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ZDA), kot reakcijsko mešanico pa komercialno dostopne reagente TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, ZDA). Omenjena reakcijska mešanica vsebuje: polimerazo AmpliTaq® Fast DNA, termostabilne encime, dNTP-je (dATP, dGTP, dCTP in dTTP), rekombinantne ribonukleazne inhibitorje RNaseOUT™, pasivno referenčno barvilo ROX™ in pufer. Mešanici smo dodali še oligonukleotidna začetnika (TIB MOLBIOL, Nemčija), in sicer: pozitivno usmerjeni oligonukleotidni začetnik ali AdF (ang. *forward primer*) ter negativno usmerjeni oligonukleotidni začetnik ali AdR (ang. *reverse primer*), s katerima smo pomnožili 132 baznih parov dolgo adenovirusno področje heksonskih genov. Poleg oligonukleotidnih začetnikov smo mešanici dodali še sondu, demineralizirano destilirano vodo (Promega, ZDA) in preiskovani vzorec. Reagenti v reakcijski mešanici so predstavljeni v Preglednici II (42).

**Preglednica II:** Reagenti prisotni v reakcijski mešanici qPCR in njihove količine.

REAGENTI	KOLIČINA (µl)	KONČNA KONCENTRACIJA (µM)
<b>TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix 4x:</b>  AmpliTaq® Fast DNA polimeraza, termostabilni encimi, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, RNaseOUT™ rekombinantni ribonukleazni inhibitorji, barvilo ROX™, pufer	5	
<b>AdV-F (50µM):</b>  5'-GCCACGGTGGGGTTCTAAACTT-3'	0,16	400
<b>AdV-R (50µM):</b>  5'-GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'	0,16	400
<b>Sonda (20µM):</b>  5'-FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-VIC-3'	0,2	200
<b>ddH2O</b>	9,48	
<b>Vzorec:</b>  Osamljene nukleinske kisline	5	

### 3.2.3.3 Protokol metode qPCR

Iz supernatantov vzorcev osamljene nukleinske kisline smo iz zamrzovalne skrinje (- 20 °C) postavili v zaščitno čisto komoro na sobno temperaturo, da so se odtajale, medtem pa smo pripravili reakcijsko mešanico. Oligonukleotidne začetnike in sonde smo imeli shranjene v hladilniku na + 4 °C, komercialno reakcijsko mešanico pa na - 20 °C v zamrzovalni skrinji za reagente. V čisti komori smo nato pripravili delovno reakcijsko mešanico, ki smo jo po 20 µL odpipetirali v vsako od 96 vdolbinic mikrotitrsko plošče (Applied Biosystems, ZDA). V prvo vdolbinico mikrotitrsko plošče smo nato odpipetirali pozitivno kontrolo (DNA adenovirusa), v drugo ddH<sub>2</sub>O kot negativno kontrolo, v preostale pa, po vnaprej pripravljeni shemi, nukleinske kisline posameznih vzorcev. Tako pripravljeno reakcijsko ploščo smo vstavili v aparat StepOne™ Real-Time PCR System in nastavili protokol ciklično spreminjajočih se temperturnih pogojev, ki so ustrezali naši reakcijski mešanici (Preglednica III): reverzna transkripcija (5 minut pri 50 °C), inaktivacija reverzne transkripcije in začetna denaturacija (20 sekund pri 95 °C) in nato 40 ciklov prileganja oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanja novonastalih verig (42).

**Preglednica III:** Temperaturni cikli komercialno dostopne reakcijske mešanice za namen qPCR.

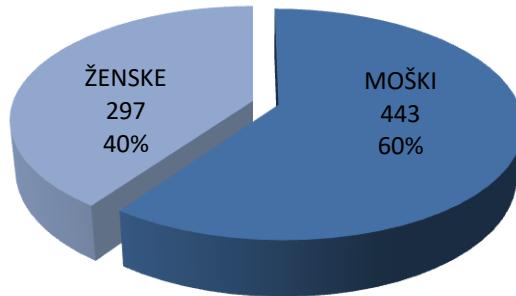
KORAK	ŠTEVIL CIKLOV	ČAS	°C
Reverzna transkripcija	1	5 minut	50
Inaktivacija reverzne transkripcije/Začetna denaturacija	1	20 sekund	95
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige	40	3 sekunde	95
		30 sekund	60

## 4 REZULTATI

### 4.1 VZORCI

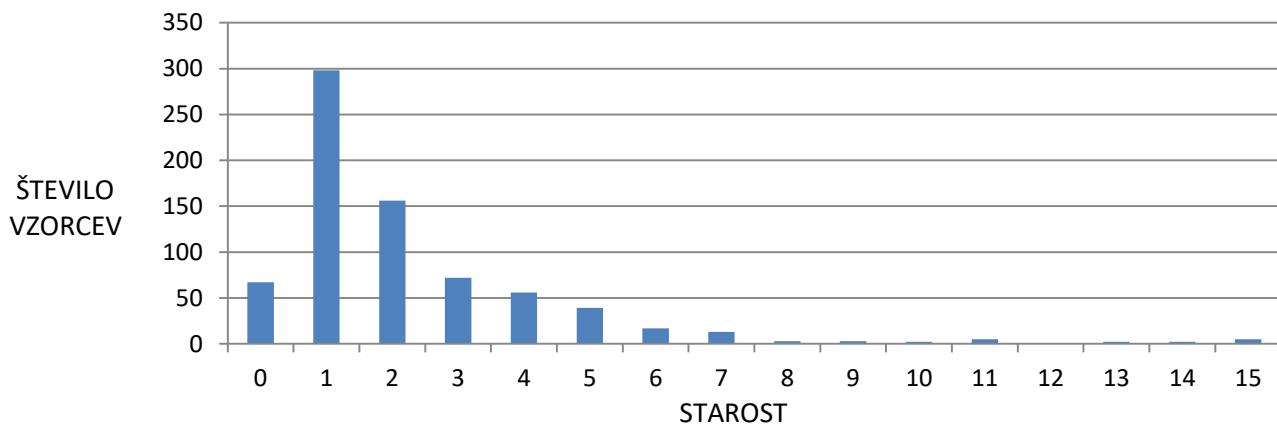
V raziskavo smo vključili 740 kliničnih vzorcev, ki so jih poslali s Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (Univerzitetni klinični center v Ljubljani) v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani). Za vzorce je bila v naročena preiskava na prisotnost adenovirusnega antigena z metodo DIF. Naknadno smo iz njihovih preostankov osamili virusne nukleinske kisline in jih ponovno testirali še z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).

Glede na spol je 443 (60 %) vzorcev pripadalo moškim, 297 (40 %) pa ženskam (Slika 6).



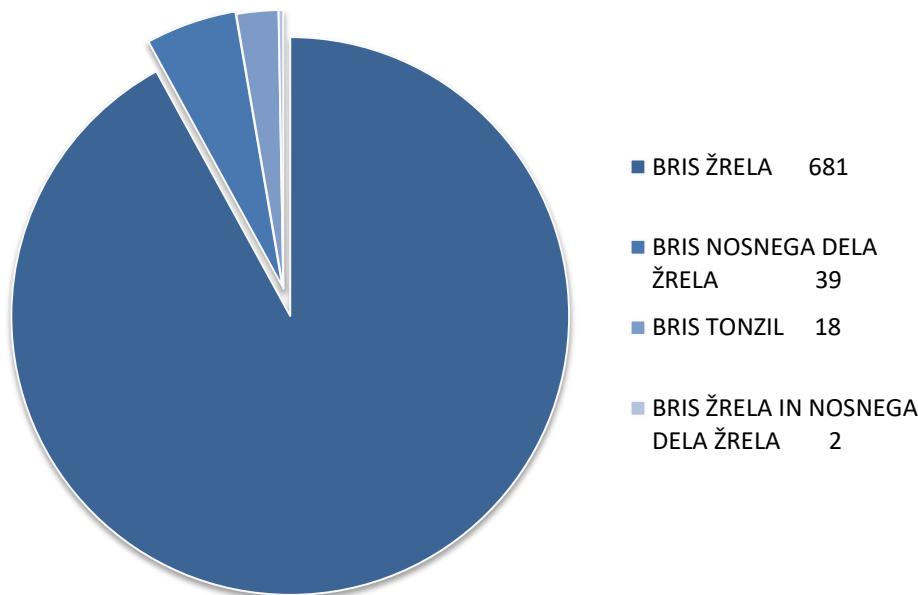
**Slika 6:** Porazdelitev vzorcev glede na spol.

Starostni razpon preiskovanih bolnikov je bil med 0 in 15 let; 298 (40,3 %) vzorcev je pripadalo otrokom do 1 leta starosti, kar 593 (80 %) vzorcev pa tistim, mlajšim od 3 let (Slika 7).



**Slika 7:** Številčna porazdelitev vzorcev glede na starost bolnikov.

Med vsemi 740 vzorci je bilo 681 (92 %) brisov žrela, 39 (5,3 %) brisov nosnega dela žrela, 18 (2,5 %) brisov nebnic in 2 (0,2 %) brisa žrela, ki sta bila hkrati tudi brisa nosnega dela žrela (Slika 8).



**Slika 8:** Porazdelitev vzorcev glede na vrsto vzorca.

## 4.2 REZULTATI TESTIRANJ

### 4.2.1 Neposredna imunofluorescanca (DIF)

V okviru redne diagnostike virusnih okužb dihal z metodo DIF smo med skupno 740 vzorci okužbo z adenovirusi potrdili v 219 (29,6 %) primerih, preostalih 521 (70,4 %) vzorcev pa smo opredelili kot negativne (Preglednica IV).

**Preglednica IV:** Število pozitivnih in negativnih rezultatov določenih z metodo neposredne imunofluorescence (DIF).

#### NEPOSREDNA IMUNOFLUORESCENCA (DIF)

POZITIVNO	219 (29,6 %)
NEGATIVNO	521 (70,4 %)
SKUPAJ	740 (100 %)

### 4.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

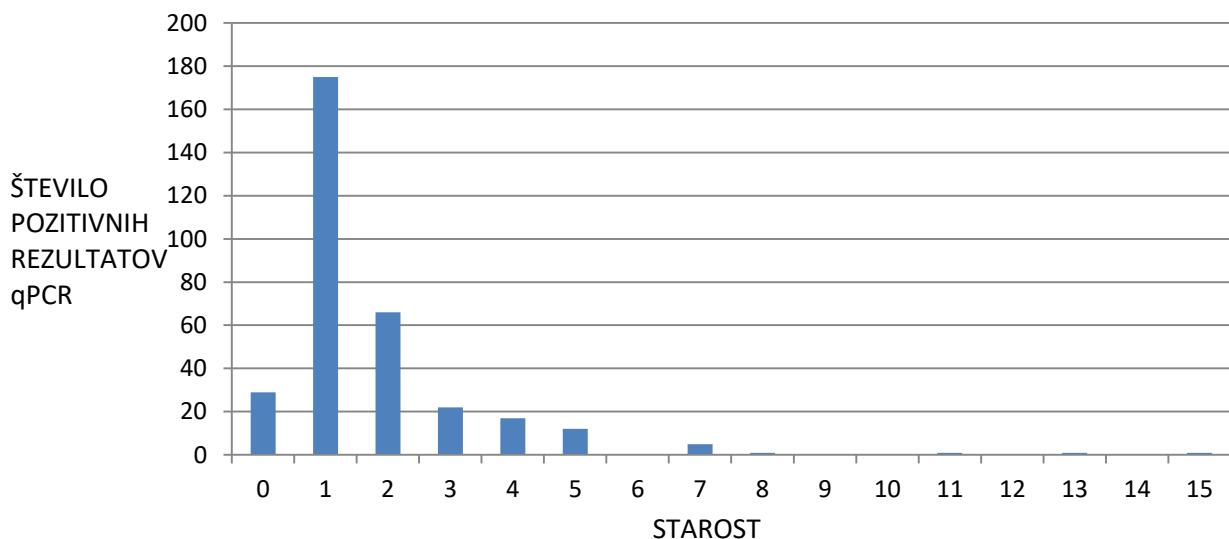
S primerjalno molekularno metodo (qPCR) smo ponovno testirali vseh 740 vzorcev. Adenovirusno DNA smo dokazali v 330 (44,6 %) primerih, pri 410 (55,4 %) vzorcih pa smo potrdili predhodno negativen rezultat določen z metodo DIF (Preglednica V).

**Preglednica V:** Število pozitivnih in negativnih rezultatov določenih z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR).

#### VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR)

POZITIVNO	330 (44,6 %)
NEGATIVNO	410 (55,4 %)
SKUPAJ	740 (100 %)

Število pozitivnih rezultatov, ki smo jih dobili z metodo qPCR je bilo pričakovano največje v najštevilčnejši skupini vzorcev bolnikov, starih eno leto, in sicer kar 175 (Slika 9).



**Slika 9:** Porazdelitev pozitivnih rezultatov določenih z metodo qPCR glede na starost bolnikov.

#### 4.3 PRIMERJAVA METOD

V 740 vzorcih, ki so bili poslani na testiranje prisotnosti adenovirusnega antiga na metodo DIF, smo v 219 (29,6 %) primerih dokazali prisotnost adenovirusnega antiga, 521 (70,4 %) vzorcev pa je bilo negativnih. Z metodo qPCR smo v enakih vzorcih dobili 330 (44,6 %) pozitivnih in 410 (55,4 %) negativnih rezultatov. Z metodo qPCR smo torej adenovirusno okužbo dokazali pri 111 (15 %) bolnikih več kot v primeru uporabe metode DIF.

V Preglednici VI vidimo, da so se pozitivni rezultati, določeni z obema metodama, ujemali v 210 (28,4 %) primerih, negativni pa v 401 (54,2 %) primeru. Neujemanja so se pojavila pri 120 (16,2 %) negativnih vzorcih analiziranih z metodo DIF, ki so bili nato po testiranju z metodo qPCR pozitivni in pri 9 (1,2 %) vzorcih, ki so bili pozitivni z metodo DIF, nato pa negativni z metodo qPCR. Število neskladnih pozitivnih in negativnih rezultatov je bilo torej 129 (17,4 %).

**Preglednica VI:** Kontingenčna tabela 2x2, ki prikazuje števila resnično pozitivnih, lažno pozitivnih, lažno negativnih in resnično negativnih rezultatov pridobljenih z metodama DIF in qPCR, s katerimi smo nato izračunali občutljivost in specifičnost metode DIF.

REZULTATI TESTIRANJ Z MOLEKULARNO METODO qPCR			
REZULTATI TESTIRANJ Z RUTINSKO METODO DIF	POZITIVNI	NEGATIVNI	SKUPAJ
POZITIVNI	<b>210 (28,4 %)</b>	<b>9 (1,2 %)</b>	219 (29,6 %)
NEGATIVNI	<b>120 (16,2 %)</b>	<b>401 (54,2 %)</b>	521 (70,4 %)
SKUPAJ	330 (44,6 %)	410 (55,4 %)	<b>740 (100 %)</b>

## 4.4 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

### 4.4.1 Občutljivost metode DIF

Z metodo qPCR, ki velja za »zlati standard« dokazovanja adenovirusnih okužb, smo prisotnost adenovirusne DNA potrdili pri 330 (44,6 %) bolnikih (Preglednica VI). Z metodo DIF pa smo pri testiranju enakih vzorcev dobili 210 (28,4 %) resnično pozitivnih in 120 (16,2 %) lažno negativnih rezultatov (Preglednica VI). Na osnovi teh podatkov smo izračunali občutljivost metode DIF kot sledi:

$$OBČUTLJIVOST = RP \div (RP + LN) = 210 \div (210 + 120) = 64\%$$

Občutljivost metode DIF ozioroma njeno sposobnost, da pravilno identificira prisotnost bolezni (v našem primeru adenovirusno okužbo) v obliki pozitivnega rezultata, je bila 64 %.

#### 4.4.2 Specifičnost metode DIF

Od 410 (55,4 %) vzorcev, v katerih z metodo qPCR nismo dokazali prisotnosti adenovirusne DNA, smo z metodo DIF kot resnično negativne opredelili 401 (54,2 %), 9 (1,2 %) pa jih je bilo lažno pozitivnih (Preglednica VII). Specifičnost metode DIF smo izračunali z naslednjo enačbo:

$$SPECIFIČNOST = RN \div (RN + LP) = 401 \div (401 + 9) = 98\%$$

Specifičnost metode DIF oziroma njena zmožnost, da pravilno zazna negativne izide pri čemer so rezultati testa negativni, je bila 98 %.

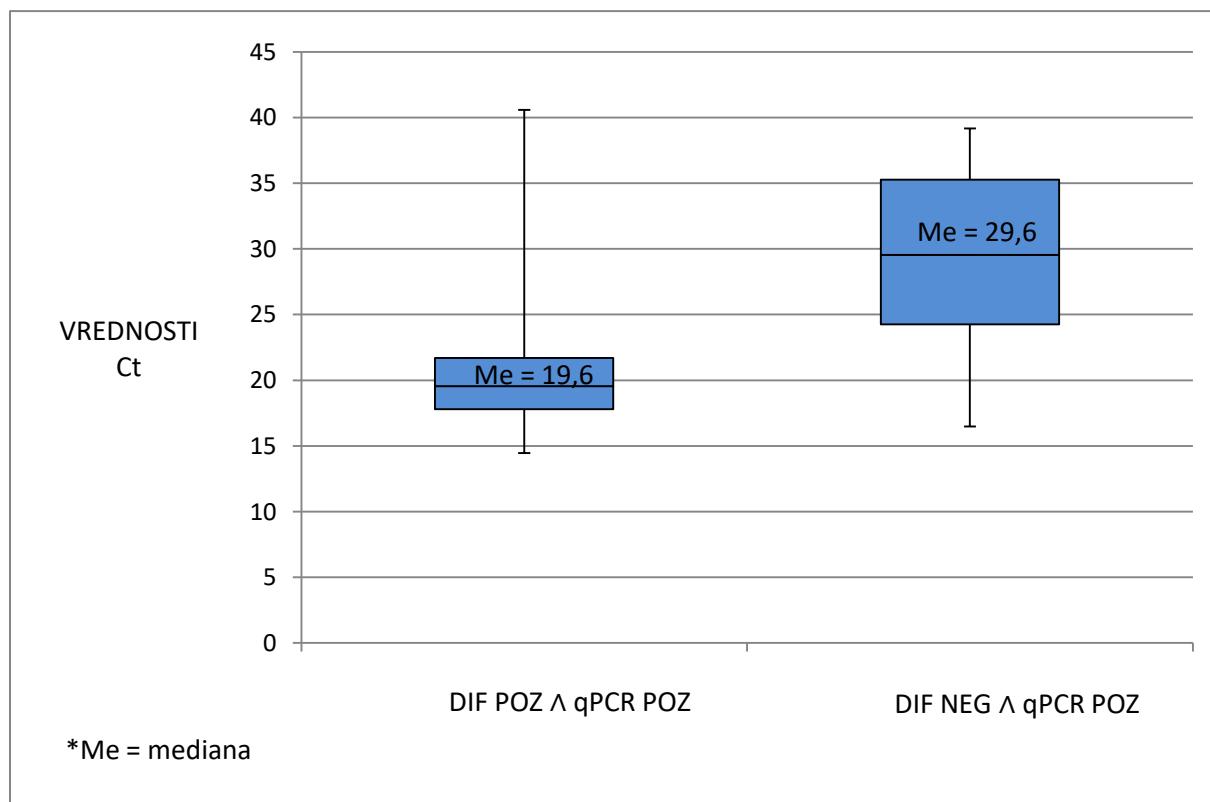
**Preglednica VII:** Kontingenčna tabela 2x2, ki prikazuje števila resnično pozitivnih, lažno pozitivnih, lažno negativnih in resnično negativnih rezultatov pridobljenih z metodama DIF in qPCR, s katerimi smo nato izračunali občutljivost in specifičnost metode DIF.

REZULTATI TESTIRANJ Z MOLEKULARNO METODO qPCR			
REZULTATI TESTIRANJ Z RUTINSKO METODO DIF	POZITIVNI	NEGATIVNI	SKUPAJ
POZITIVNI	RP = resnično pozitivni <b>210</b>	LP = lažno pozitivni <b>9</b>	219
NEGATIVNI	LN = lažno negativni <b>120</b>	RN = resnično negativni <b>401</b>	521
SKUPAJ	330	410	<b>740</b>

## 4.5 VREDNOSTI Ct

Vrednost Ct (ang. *threshold cycle*) smo določili za vsak vzorec, v katerem se je virusna DNA uspešno pomnožila. Vrednost Ct predstavlja fluorescenco pomnoženih pridelkov, ki preseže fluorescenco ozadja in nam omogoča relativno kvantifikacijo pomnožene tarčne nukleinske kisline (38).

V primeru 210 pozitivnih rezultatov, ki smo jih določili z obema metodama, je bila srednja vrednost vrednosti Ct = 20,2, mediana pa 19,6 (Slika 10). Pri 120 vzorcih, ki smo jih z metodo DIF opredelili kot negativne, kasneje pa smo jih z metodo qPCR določili kot pozitivne, pa sta bili srednja vrednost in mediana vrednosti Ct = 29,6. Razlika v srednjih vrednostih Ct primerjanih skupin je bila 9,4, razlika v medianah pa 10.



**Slika 10:** Okvirja z ročaji, ki prikazujeta mediani vrednosti Ct pozitivnih vzorcev potrjenih z obema metodama (levo) in negativnih vzorcev, določenih z metodo DIF, ki smo jih kasneje z metodo qPCR določili kot pozitivne (desno). Prikazani sta najmanjši in največji vrednosti, mediani ter 1. in 3. kvartil.

#### 4.5.1 Studentov t-test za primerjavo neodvisnih vzorcev

Studentov t-test za primerjavo neodvisnih vzorcev uporabimo za ugotavljanje statistično pomembnih razlik med dvema neodvisnima skupinama spremenljivk (31).

Izmerjene rezultate smo uredili s programom MS Excel (Microsoft, 2010) in jih statistično analizirali s programom IMB SPSS za Windows [verzija 20.0].

V statistično analizo smo vključili vrednosti Ct 210 vzorcev, ki smo jih z obema metodama opredelili kot pozitivne in 120 tistih, za katere smo z metodo DIF ugotovili, da so bili negativni, nato pa smo jih z metodo qPCR opredelili kot pozitivne. V Preglednici VIII so prikazane vrednosti aritmetičnih sredin Ct ter njunih standardnih deviacij in standardnih napak.

**Preglednica VIII:** Pregled osnovnih značilnosti vrednosti Ct vzorcev, ki so bili pozitivni z obema metodama (DIF in qPCR) in vzorcih, negativnih z metodo DIF, a pozitivnih z metodo qPCR.

SPLOŠNE ZNAČILNOSTI VREDNOSTI Ct		
	DIF POZ ∧ qPCR POZ	DIF NEG ∧ qPCR POZ
ŠTEVILO	210	120
ARITMETIČNA SREDINA	20,2103	29,5668
SD	3,6563	6,2974
SEM	0,2523	0,5749

S Shapiro-Wilkovim testom smo preverili normalnost porazdelitve vrednosti Ct in ugotovili, da se obe skupini porazdeljujeta normalno, saj sta bili izračunani vrednosti p v obeh primerih večji od 0,05 ( $p > 0,05$ ).

---

S t-testom smo preverjali (ne)enakost aritmetičnih sredin vrednosti Ct oziroma veljavnost ničelne ali alternativne hipoteze:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ ; aritmetični sredini primerjanih skupin vzorcev sta enaki - povprečni vrednosti Ct nista statistično značilno različni.

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ; aritmetični sredini primerjanih skupin vzorcev nista enaki - povprečni vrednosti Ct sta statistično značilno različni.

**Preglednica IX:** Vrednosti parametrov Studentovega t-testa za primerjavo neodvisnih vzorcev.

STUDENTOV t-TEST ZA NEODVISNE VZORCE	
DVOSTRANSKI TEST	DA
VREDNOST t	17,08
STOPNJE PROSTOSTI (df)	328
p VREDNOST	<0,0001
STATISTIČNO ZNAČILNA RAZLIKA ( $p < 0,05$ )	DA

Podatki v Preglednici IX dokazujejo, da obstaja med povprečnima vrednostima Ct vzorcev, ki so bili pozitivni z obema metodama in tistih, ki so bili z metodo DIF negativni in hkrati z metodo qPCR pozitivni, statistično značilna razlika. Vrednost p je manjša od stopnje tveganja  $\alpha$ , zato zavrhemo ničelno in sprejmemo alternativno hipotezo.

## 5 RAZPRAVA

Človeški adenovirusi (HAdV) so virusi z dvojnovijačno DNA, ki spadajo v družino *Adenoviridae*. So povzročitelji številnih bolezni in pogost vzrok okužb zgornjih in spodnjih dihalnih poti pri otrocih in odraslih. Manj pogosto povzročajo okužbe prebavil, oči, sečil in živčevja (20). Adenoviruse so odkrili leta 1953, danes pa jih prištevamo med najpogosteje povzročitelje virusnih okužb (6). Viruse HAdV delimo v sedem vrst, od A do G, trenutno pa poznamo že več kot 67 adenovirusnih serotipov (5).

Z adenovirusi se lahko okužimo kjerkoli po svetu. Zanje je značilno, da se lahko okužbe pojavljajo bodisi skozi vse leto, le občasno ali pa endemično (6). Adenovirusi so pogosti spremljevalci bakterijskih okužb, največkrat se pojavljajo skupaj s *S. pneumoniae*, *H.influenzae* in *M. catarrhalis*, in drugih virusov, kot na primer rinovirusov, respiratornega sincicijskega virusa, virusa influence (19, 20). Zdravi otroci okužbo z adenovirusom prebolijo brez večjih težav, so pa znani tudi serotipi (HAdV-B3, HAdV-B7, HAdV-B14), ki lahko povzročijo težjo obliko bolezni, v državah tretjega sveta pa pogosto tudi smrt obolelih (17).

Na področju virologije za dokazovanje virusnih okužb najpogosteje uporabljamo celične kulture, neposredno imunofluorescenco (DIF), encimsko-imunski test, elektronsko mikroskopijo, aglutinacijo lateksnih delcev in verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Pozitivne lastnosti molekularne metode qPCR, kot so občutljivost, specifičnost, hitrost, uporaba zaprtega avtomatiziranega sistema z majhnim tveganjem za kontaminacijo, širok spekter uporabnosti ter enostavna vpeljava, umeščajo qPCR, med vsemi metodami, ki jih uporabljamo za dokazovanje adenovirusnih okužb, na položaj »zlatega standarda« (43).

Med novejše in še občutljivejše metode dokazovanja adenovirusov Bonot in sodelavci uvrščajo imunsko reakcijo s polimerazo v realnem času (iPCR), kjer predhodna osamitev nukleinskih kislin ni potrebna (23).

Namen našega dela je bil primerjati rezultate testiranj z rutinsko metodo neposredne imunofluorescence (DIF) s tistimi, ki smo jih določili z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). V Laboratoriju za diagnostiko virusih infekcij (Inštitut

za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) smo najprej rutinsko testirali vzorce na prisotnost adenovirusnega antiga z metodo DIF, nato pa iz njihovih preostankov osamili nukleinske kisline ter jih testirali še z molekularno metodo qPCR.

Skupno smo testirali 740 bioloških vzorcev, ki so jih poslali s Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (Univerzitetni klinični center Ljubljana), v časovnem obdobju od 09.04.2011 do 13.03.2014. Od teh jih je 443 (60%) pripadalo bolnikom in 297 (40%) bolnicam. Njihov starostni razpon je bil od 0 do 15 let. Večino, to je 593 (80 %) vzorcev, je bilo odvzetih bolnikom do 3. leta starosti, najbolj zastopana starostna skupina pa so bili otroci mlajši od 1 leta (298 vzorcev ali 40,3 %).

Kužnina, ki smo jo najpogosteje testirali, je bila bris žrela (681 vzorcev ali 92 %). Razlog za to pa je poseben dogovor med klinikijo in laboratorijem, da zaradi standardnega testiranja z metodo DIF in nekoliko lažjega odvzema vzorca, namesto nosnega dela žrela vzorčijo njegov ustni del.

Rezultate, ki smo jih dobili z rutinsko preiskavo z metodo DIF, smo primerjali z rezultati molekularne metode qPCR. Adenovirusni antigen smo z metodo DIF zaznali v 219 (29,6 %) od 740 testiranih kužnin, prisotnost adenovirusne nukleinske kisline (metoda qPCR) pa smo določili pri 330 (44,6 %) bolnikih, to pomeni kar 111 (15 %) več pozitivnih primerov. S tem smo potrdili naša pričakovanja, da je molekularna metoda qPCR veliko bolj občutljiva od metode DIF, kar so pokazale tudi sorodne raziskave (44).

V najbolj zastopani skupini bolnikov starih leto ali manj, smo pričakovano določili največji delež, to je 175 ali 53 % od vseh 330 pozitivnih rezultatov.

Iz podatkov smo izračunali občutljivost in specifičnost metode DIF glede na metodo qPCR. Za molekularno metodo smo privzeli, da sta zanjo značilni 100 % občutljivost in specifičnost.

Glede na naše izračune je imela metoda DIF 64 % občutljivost, kar pomeni, da bi z njo pri 64 bolnikih z adenovirusom od skupno 100, pravilno napovedali okužbo, pri preostalih 46 pa bi dobili lažno negativne rezultate. Občutljivost metode DIF za detekcijo adenovirusov torej ni ustrezena, kar smo potrdili tudi z našimi izsledki (36). V primeru 120 (16,2 %) vzorcev smo dobili lažno negativne rezultate. Ker adenovirusne okužbe nismo dodatno potrjevali z uporabo

celičnih kultur, tako nismo mogli v celoti izključili možnosti latentnih okužb z adenovirusno vrsto C, ki bolnikom sicer ne povzroča zdravstvenih težav (30). V tem primeru je 70 vzorcev pripadalo otrokom starim leto ali manj.

Z molekularno metodo qPCR nam je uspelo opredeliti 9 lažno pozitivnih rezultatov, ki smo jih kot pozitivne dobili z metodo DIF. Teh 9 lažno pozitivnih rezultatov je predstavljalo 1,2 %. Z njimi smo določili specifičnost metode DIF, ki je bila 98 %. V primeru 100 neokuženih posameznikov bi tako z metodo DIF v 98 primerih pravilno napovedali negativen rezultat, v 2 primerih pa bi dobili lažno pozitivna. V primeru omenjenih 9 lažno pozitivno opredeljenih rezultatov smo menili, da so bili ti bolniki okuženi z adenovirusom. Predvidevamo tudi, da v kolikor bi imeli bakterijske okužbe dihal in ne bi dobili primerne antibiotične terapije, bi lahko kazali simptome zelo podobne okužbi z adenovirusom (25). Ti otroci so bili stari 6 let ali manj, kar 5 med njimi pa je bilo starih leto ali manj.

Vsakemu pozitivnemu vzorcu smo z metodo qPCR določili vrednost Ct, ki predstavlja količino virusne nukleinske kisline v vzorcu. Če je njena vrednost nizka, govorimo o velikem virusnem bremenu in obratno (45). Pričakovali smo, da bosta mediana in povprečna vrednost vrednosti Ct nižja pri vzorcih, ki so bili pozitivni z obema metodama, v primerjavi s tistimi, ki bodo pozitivni samo z metodo qPCR. Mediana predstavlja vrednost nad in pod katero je polovica vseh meritev. Na Sliki 10 vidimo, da je bila mediana vrednosti Ct pri 210 pozitivnih rezultatih dobljenih z obema metodama 19,6 in povprečna vrednost 20,2, mediana in povprečna vrednost 120 rezultatov, ki so bili pozitivni samo s qPCR pa 29,6. Med medianama je 10 enot razlike, med povprečnima vrednostima pa 9,4.

S primerjavo vrednosti Ct pozitivnih vzorcev smo potrdili pričakovani rezultat. V primerih, kjer smo adenovirusno okužbo potrdili z obema metodama, so bile vrednosti Ct nižje od tistih, določenih v skupini vzorcev, v katerih smo prisotnost adenovirusne nukleinske kisline dokazali samo z metodo qPCR. Na podlagi višjih vrednosti Ct v tem primeru sklepamo, da je bila v vzorcih prisotna nižja količina tarčne nukleinske kisline oziroma nižja količina virusa, kar je bil najverjetnejše tudi vzrok, da smo v kar 120 primerih z metodo DIF dobili lažno negativne rezultate.

S Studentovim t-testom za primerjavo neodvisnih vzorcev smo preverjali enakost aritmetičnih sredin vrednosti Ct vzorcev, ki so bili pozitivni tako z metodo DIF kot z metodo qPCR ter

vrednosti Ct tistih, ki so bili z metodo DIF negativni, pozitivni pa z metodo qPCR. Ugotovili smo, da je bila vrednost p manjša od stopnje tveganja  $\alpha$ , zato smo zavrgli ničelno in sprejeli alternativno hipotezo. S tem smo dokazali, da obstaja med povprečnimi vrednostmi Ct vzorcev, ki so bili pozitivni z obema metoda in tistimi, ki smo jih določili pri DIF negativnih, a qPCR pozitivnih vzorcih, statistično značilna razlika.

V nedavni raziskavi so ameriški raziskovalci ugotovili, da kljub uporabi metode qPCR, kvalitativni pozitivni rezultati testiranja iz vzorcev nosnega dela žrela niso dober napovedni dejavnik vzročne povezanosti klinične bolezni in okužbe z adenovirusi (10). Ugotovili so, da so vzorci pozitivni z metodo qPCR, pri katerih z osamitvijo v celični kulturi niso uspeli potrditi prisotnosti adenovirusov, pozitivni najverjetneje zaradi latentne okužbe z adenovirusi, še posebej s predstavniki vrste C. Zato so predlagali, da bi morali zaradi lažjega razlikovanja med aktivnimi in latentnimi okužbami, poleg kvalitativne izvesti tudi vsaj semikvantitativno določitev adenovirusne DNA, ob sočasni določitvi vrste adenovirusa (10). Tudi mi smo pri precejšnjem številu vzorcev določili vrednosti Ct  $> 35$ , zato sklepamo, da bi pred morebitno uvedbo metode qPCR v rutinsko uporabo morali opraviti še natančno analizo kliničnih podatkov, na osnovi katerih bi nato poskušali opredeliti območje vrednosti Ct, ki bi se kar najbolje ujemalo s kliničnimi znaki.

Naša raziskava je temeljila na vzorcih kužnin bolnikov starih od 0 do 15 let, ki so jih poslali v testiranje samo s Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (Univerzitetni klinični center v Ljubljani). Izsledke naše raziskave bi bilo tako smiselno primerjati z rezultati na enak način testiranih (metoda DIF in qPCR) vzorcev, odvzetih odraslim osebam s sumom na adenovirusno okužbo dihal, kot tudi vzorcev kužnin otrok, obravnavanih na drugih oddelkih in klinikah.

## 6 SKLEPI

- Od skupno 740 analiziranih vzorcev jih je 593 (80 %) pripadalo populaciji, mlajši od 3 let. Večino od njih so poslali v rutinsko diagnostiko zaradi suma na adenovirusno okužbo dihal in so bili odvzeti bolnikom v drugem letu starosti. Pričakovano je tako največ pozitivnih rezultatov določenih z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR), v skupini bolnikov med prvim in drugim letom starosti.
- Najpogosteje zastopana kužnina, ki smo jo testirali je bila bris žrela (92 %).
- Z metodo qPCR smo prisotnost adenovirusnih nukleinskih kislin dokazali v 330 (44,6 %) vzorcih, medtem ko smo predhodno z metodo DIF določili 219 (29,6 %) pozitivnih vzorcev. Poleg tega smo z metodo qPCR 9 (1,2 %) vzorcev, ki so bili pozitivni z metodo DIF, opredelili kot lažno pozitivne.
- Če bi žeeli potrditi 120 (16,2 %) lažno negativnih rezultatov določenih z metodo DIF, ki so bili nato z metodo qPCR pozitivni, bi morali prisotnost adenovirusne okužbe dokazati še v celičnih kulturah. Tako nismo mogli izključili možnosti latentne okužbe z adenovirusi iz vrste C, ki se nahajajo v adenoidnem tkivu in ne predstavljajo vzroka za bolnikove klinično izražene težave.
- Izračunali smo tudi občutljivost in specifičnost metode DIF. Občutljivost metode DIF je bila 64 %, specifičnost pa 98 %. Zaključimo lahko, da smo z izbiro molekularne metode qPCR dokazali več adenovirusnih okužb kot z metodo DIF.
- Glede na povprečno vrednost vrednosti Ct sklepamo, da je bilo v vzorcih, ki so bili pozitivni z obema metodama (povprečna vrednost vrednosti Ct = 20,2), prisotno večje virusno breme, kakor v tistih, ki so bili pozitivni zgolj z metodo qPCR, pri katerih je bila povprečna vrednost vrednosti Ct = 29,6.

- S Studentovim t-testom za primerjavo neodvisnih vzorcev smo dokazali, da je bila razlika med omenjenima vrednostma Ct statistično značilna.

## 7 LITERATURA

1. Lion T: Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. Clinical Microbiology Reviews 2014; 27: 441 - 462.
2. Epidemiology and clinical manifestations of adenovirus infection.  
Dostopno na internetni strani:  
<http://www.uptodate.com/contents/adenovirus-pathogenesis-and-vector-applications.html> (28.03.2016).
3. Ross PJ, Parks JR: Construction and Characterization of Adenovirus Vectors. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2009; 4: 1-13.
4. San Martin C: Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. Viruses 2012; 4: 847-877.
5. Robinson MC, Singh G, Lee YJ, Dehghan S, Rajaiya J, Liu BE, Yousuf AM, Betensky AR, Jones SM, Dyer WD, Seto D, Chodosh J: Molecular Evolution of Human Adenoviruses. Scientific Reports 2013; 3: 1-7.
6. Poljak M, Petrovec M: Medicinska virologija, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2011: 9 - 14.
7. Reddy SV, Natchiar SK, Stewart LP, Nemerow RG: Crystal Structure of Human Adenovirus at 3.5 Å Resolution. Science 2010; 329: 1071-1075.
8. Adenoviruses.  
Dostopno na internetni strani:  
<http://www.slideshare.net/doctorrao/adenovirus-14696116.html> (03.07.2016).
9. Russell CW: Adenoviruses: update on structure and function. Journal of General Virology 2009; 90: 1 - 20.

10. Song E, Wang H, Kajon AE, Salamon D, Dong S, Ramilo O, Leber A, Jaggi P: Diagnosis of Pediatric Acute Adenovirus Infections: Is a Positive PCR Sufficient? The Pediatric Infectious Disease Journal 2016; 35: 827 - 344.
11. Ryan ME, Keck T, Musso MF, Capp KC: Differentiating Kawasaki Syndrome From Microbial Infection. Infections in Medicine 2008; 25: 311 – 316.
12. Wold SMW, Toth K: New Drug on the Horizon for Treating Adenovirus. Expert Opinion on Pharmacotherapy 2015; 16 (14): 2095 - 2099.
13. Adenovirus Vaccine.  
Dostopno na internetni strani:  
<http://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/adenovirus.pdf>,  
html (13.03.2016).
14. Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia TA, Byington LC: Adenoviral Infections in Children The Impact of Rapid Diagnosis. Pediatrics 2004; 113: 51 - 56.
15. Alharbi S, Caeseele VP, Consunji-Araneta R, Zoubeidi T, Souid AK, Alsuwaidi AR: Epidemiology of Severe Pediatric Adenovirus Lower Respiratory Tract Infections in Manitoba, Canada, 1991-2005. Infectious Diseases 2012; 12: 1 - 8.
16. Esposito S, Zampiero A, Bianchini S, Mori A, Scala A, Tagliabue C, Sciarrabba CS, Fossali E, Piralla A, Principi N: Epidemiology and Clinical Characteristics of Respiratory Infections Due to Adenovirus in Children Living in Milan, Italy, during 2013 and 2014. PloS ONE 2016; 11: 1 – 15.
17. Nepomuceno Luiz L, Gagliardi Leite JP, Yokosawa J, Carneiro BM, Pereira Filho E, De mattos Oliveira TF, Oliveira e Freitas GR: Molecular Characterization of Adenoviruses from Children Presenting with Acute Respiratory Disease in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, and Detection of an Isolate Genetically Related to Feline Adenovirus. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105: 712 - 716.

18. Niedermeier A, Pfützer W, Ruzicka T, Thomas P, Happle R: Superimposed Lateralized Exanthem of Childhood: Report of a Case Related to Adenovirus Infection. *Clinical and Experimental Dermatology* 2013; 39: 351 – 353.
19. Huijskens EGW, Van Erkel AJM, Palmen FMH, Buiting AGM, Kluytmans JA JW, Rossen JWA: Viral and Bacterial Etiology of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Influenza Journal* 2012; 7 (4): 567 - 573.
20. Calvo C, Garcia GML, Sanchez-Debesa R, Roman C, Tabares A, Pazo F, Casas I: Eight Year Prospective Study of Adenoviruses Infections in Hospitalized Children. Comparison with Other Respiratory Viruses. *Journal PLoS ONE* 2015; 10 (7): 1 - 10.
21. Chen SP, Huang YC, Chiu CH, Wong KS, Huang YL, Huang CG, Tsao KC, Lin TY: Clinical Features of Radiologically Confirmed Pneumonia due to Adenovirus in Children. *Journal of Clinical Virology* 2013; 56: 7 - 17.
22. Trabelsi A, Pozzetto B, Mbida AD, Grattard F, Rosa A, Gaudin OG: Evaluation of Four Methods for Rapid Detection of Adenovirus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1992; 6: 535 – 539.
23. Bonot S, Ogorzaly L, El Moualij B, Zorzi W, Cauchie HM, Detection of Small Amounts of Human Adenoviruses in Stool: Comparison of a New Immuno Real-Time PCR Assay with Classical Tools. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20: 1010 – 1016.
24. Sadeghi CD, Aebi C, Gorgievski-Hrisoho M, Muehlermann K, Barbani MT: Twelve Years' Detection of Respiratory Viruses by Immunofluorescence in Hospitalised Children. *Infectious Diseases* 2011; 10: 1 - 7.
25. Robinson JP, Sturgis J, Kumar LG: Immunohistochemical Staining Methods, Fifth Edition 2009, Chapter 10, Immunofluorescence: 61 – 65.
26. Yagmur G, Altun UH, Goekahmetoglu S, Basok E: Comparison of Manual and Automated Nucleic Acid Isolation Methods for HBV-DNA and HCV-RNA Assays. *Le Infezioni in Medicina* 2015; 3: 247 - 252.

27. Reischl U, Bollwein M, Alberdi MB, Girgnhuber H, Malmberg W, Nieswan V, Zielenski R, Kirchgesser M: Automated Rapid Isolation of Bacterial DNA from Various Samples Using the MagNA Pure Compact System. *Gene Expression Biochemica* 2005; 2: 12 - 15.
28. Valasek MA, Repa JJ: The Power of Real-Time PCR. *Advances in Physiology Education* 2005; 29: 151 – 159.
29. Watzinger F, Ebner K, Lion T: Detection and Monitoring of Virus Infections by Real-time PCR. *Science Direct* 2006; 27: 254 - 298.
30. Baratloo A, Hosseini M, Negida A, El Ashaal G: Simple Definition and Calculation of Accuracy, Sensitivity and Specificity. *Emergency* 2015; 3: 48-49.
31. Fagerland MW: t-tests, non-parametric tests, and large studies-a paradox of statistical practice? 2012; 12: 2 - 7 .
32. Gavin PJ, Richard B, Thomson Jr: Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2004; 4: 151 – 172.
33. Virology Blog.  
Dostopno na internetni strani:  
<http://www.virology.ws/2010/09/30/detecting-viral-proteins-in-infected-cells-or-tissues-by-immunostaining/>,  
html (03.07.2016).
34. Roche.  
Dostopno na internetni strani:  
<https://lifescience.roche.com/shop/products/magna-pure-lc-20-instrument> ,  
html (03.07.2016).
35. MagNA Pure Compact System Versatile Nucleic Acid Purification.  
Dostopno na internetni strani:  
<https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/0563624800102.12>,

html (13.03.2016).

36. Watzinger F, Ebner K, Lion T: Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 27: 254 - 298.
37. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, Niesters H GM, Lawitschka A, Lion T: Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 5189 - 5198.
38. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Foroutan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögren B, Strömbom L, Zoric N: The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27: 95 - 125.
39. Abbott Molecular.  
Dostopno na internetni strani:  
<https://www.abbottmolecular.com/maxratio-data-analysis.html>,  
html (03.07.2016).
40. SchoolWorkHelper  
Dostopno na internetni strani:  
<http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/>,  
html (03.07.2016).
41. Yuan SJ, Reed A, Chen F, Stewart Jr CN: Statistical Analysis. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 1 - 12.
42. De Vos N, Vankeerberghen A, Vaeyens F, Van Vaerenbergh K, Boel A, De Beenhouwer H: Simultaneous detection of human bocavirus and adenovirus by multiplex real-time PCR in a Belgian paediatric population. *Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 2009; 28: 1305 - 1310.
43. Lu X, Trujillo-Lopez E, Lott L, Erdman DD: Quantitative Real-Time PCR Assay Panel for Detection and Type-Specific Identification of Epidemic Respiratory Human Adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51: 1089 - 1093.

44. Pol AC, Van Loon AM, Wolfs TFW, Jansen NJG, Nijhuis M, Breteler EK, Schuurman R, Rossen JWA: Increased Detection of Respiratory Syncytial Virus, Influenza Viruses, Parainfluenza Viruses, and Adenoviruses with Real-Time PCR in Samples from Patients with Respiratory Symptoms. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 2260 - 2262.
45. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Hitendra RHP: Basic Principles of Real-time Quantitative PCR. *Future Drugs* 2005; 5: 209 - 219.