

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Andreja MOVRIN

**DOKAZOVANJE PROTITELES PROTI  
ENTEROVIRUSOM Z METODO REAKCIJE  
VEZAVE KOMPLEMENTA IN ENCIMSKO  
IMUNSKO METODO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Andreja MOVRIN

**DOKAZOVANJE PROTITELES PROTI ENTEROVIRUSOM Z  
METODO REAKCIJE VEZAVE KOMPLEMENTA IN ENCIMSKO  
IMUNSKO METODO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DEMONSTRATION OF ANTIBODIES AGAINST ENTEROVIRUSES  
WITH COMPLEMENT FIXATION TEST AND ENZYME  
IMMUNOASSAY METHOD**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Miroslava Petrovca in za recenzenta prof. dr. Alojza Ihana.

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

Recenzent: prof. dr. Alojz Ihan, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Član: prof. dr. Alojz IHAN, dr. med.

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andreja Movrin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7.083: 616-097.3(043)=163.6
- KG virusi/coxsackievirusi/enterovirusi/echovirusi/miokarditis/specifična protitelesa/encimsko imunske metode/ELISA/reakcija vezave komplemeta/RVK
- AV MOVRIN, Andreja
- SA PETROVEC, Miroslav (mentor) / IHAN, Alojz (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2011
- IN DOKAZOVANJE PROTITELES PROTI ENTEROVIRUSOM Z METODO REAKCIJE VEZAVE KOMPLEMENTA IN ENCIMSKO IMUNSKO METODO
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 38 str., 20 pregl., 5 sl., 1 pril., 21 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Enterovirusi lahko povzročajo vrsto različnih bolezni. Najpogosteje okužbe potekajo brez simptomov, vendar pa lahko povzročajo tudi zelo resna klinična stanja. Med najresnejše klinične slike okužb z enterovirusi spada miokarditis, čigar diagnostika je zelo zapletena. Laboratorijska diagnostika miokarditisa, ki ga povzročajo enterovirusi, je zahtevna zaradi izredne genetske pestrosti teh virusov. Uporabne so zlasti serološke metode, kot sta encimsko imunska metoda (ELISA) in reakcija vezave komplementa (RVK). V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti ali bi lahko testiranje na protitelesa proti enterovirusom pri bolnikih s sumom na virusni miokarditis, ki se izvaja z metodo reakcije vezave komplementa, nadomestili s sodobnejšo encimskoimunsko metodo. Zanimalo nas je tudi v kolikšnem odstotku so pri bolnikih s sumom na virusni miokarditis verjetni povzročitelji okužbe enterovirusi. V raziskavo smo vključili arhivske serumske vzorce bolnikov, ki so bili rutinsko testirani z metodo reakcije vezave komplementa, mi pa smo jih dodatno testirali z encimskoimunsko metodo. Izmed 133 testiranih serumskih vzorcev pacientov s sumom na virusni miokarditis smo protitelesa proti enterovirusom dokazali z metodo RVK v 54,9 % in z metodo ELISA v 61,2 % pregledanih vzorcev. Prisotnost protiteles z obema metodama smo ugotovili v 56 vzorcih, odstotnost protiteles pa pri 34 vzorcih. Torej je skupno ujemanje interpretacij testiranja med metodama 61,15 %. Neujemanje med metodama pa je 32,3 %. Rezultati testiranja se ne ujemajo v 43 vzorcih, pri 26 vzorcih smo protitelesa dokazali le z metodo ELISA, pri 17 pa le z metodo RVK. V vzorcih smo najpogosteje dokazali protitelesa razreda IgG. Slednja smo v večini primerov dokazali z vsemi tremi uporabljenimi testi ELISA (enterovirus, coxsackievirus, echovirus), kar kaže na navzkrižno reaktivnost ali pa na prekuženost z več tipi enterovirusov. Da bi lahko ugotovili za kakšen stadij okužbe gre pri pacientih, bi bilo zaželeno, da bi za vsakega pacienta imeli parni serum. Glede na rezultate diplomske naloge menimo, da je metoda ELISA primernejša za dokazovanje okužb z enterovirusi pri bolnikih s sumom na virusni miokarditis od metode RVK.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 578.7.083: 616-097.3(043)=163.6
- CX viruses/Coxsackieviruses/Enteroviruses/Echoviruses/myocarditis/specific antibodies/enzyme immunoassay methods/ELISA/complement fixation test/CFT
- AU MOVRIN, Andreja
- AA PETROVEC, Miroslav (supervisor) / IHAN, Alojz (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2011
- TI DEMONSTRATION OF ANTIBODIES AGAINST ENTEROVIRUSES WITH COMPLEMENT FIXATION TEST AND ENZYME IMMUNOASSAY METHOD
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 38 p., 20 tab., 5 fig., 1 app., 21 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Enteroviruses can cause a range of different diseases. In most cases the infections are asymptomatic but they can also cause very severe clinical states. One of the most severe clinical picture of infections is myocarditis, which is very difficult to diagnose. Laboratory diagnostics of myocarditis, which is caused by enteroviruses, is due to a great genetic variety of these viruses very complicated. Serological methods are the most useful in diagnostics, especially an enzyme immunoassay method (ELISA) and a complement fixation test (CFT). In this graduation thesis we have attempted to discover whether there is possible to substitute a compliment fixation test, which is used for diagnosis of antibodies against enteroviruses in the case of patients with suspicion of viral myocarditis, for an enzyme immunoassay method that would be more modern. Another thing that we have been interested in is to which extent are enteroviruses possible cause of infections with patients with the suspicion of viral myocarditis. Archival serum samples of patients have been included in the study. These patients have undergone the routine complement fixation test and have been further test with the enzyme immunoassay method. In 133 tested serum samples of patients have been antibodies to enteroviruses proved with the CFT method in 54.9 % and with the ELISA method in 61.2 % samples. In 56 samples both methods have shown the presence of antibodies and in 34 samples both have shown their absence. Therefore, the percentage of the correspondent testing of both methods is 61.15 %. However, with 32.3 % of samples the methods do not show the same results. The results of testing do not agree with 43 samples. In 26 samples we have proved antibodies only with the ELISA method and in 17 samples only the CFT method has proved their existence. Antibodies of class IgG have been the most frequently proved. These antibodies have been in most cases proved through all three ELISA tests (Enterovirus, Coxsackievirus, Echovirus), which indicates cross-reactivity or immunity against more types of enteroviruses. To be able to determine the stadium of infection it would be desirable to acquire a paired serum of each patient. According to the results of the graduation thesis we can conclude that the ELISA method is more appropriate for the verifying of enteroviral infections with patients that might be infected with viral myocarditis than the method CFT.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO PRILOG .....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV .....	X
<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 NAMEN.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	2
2.1 MIOKARDITIS IN RAZŠIRJENA KARDIOMIOPATIJA .....	2
2.2 ENTEROVIRUSI .....	3
2.2.1 Splošne značilnosti enterovirusov .....	3
2.2.2 Taksonomija.....	3
2.2.3 Epidemiologija in prenos .....	4
2.2.4 Diagnostika enterovirusnega miokarditisa .....	5
2.2.4.1 Serološke metode .....	6
2.2.4.1.1 RVK .....	6
2.2.4.1.2 ELISA .....	8
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	9
3.1 METODA ELISA .....	10
3.1.1 Vsebina kompleta .....	10
3.1.2 Priprava vzorcev za metodo ELISA .....	11
3.1.3 Preizkusni postopek.....	12
3.1.4 Vrednotenje preizkusa .....	13
3.2 METODA RVK.....	15
3.2.1 Vsebina kompleta virion/serion RVK.....	15
3.2.2 Priprava vzorcev za metodo RVK .....	15

<b>3.2.3</b>	<b>Postopek priprave seruma za ugotovitev antikomplementarne aktivnosti</b> .....	15
<b>3.2.4</b>	<b>Preizkusni postopek</b> .....	16
<b>3.2.5</b>	<b>Interpretacija rezultatov</b> .....	18
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	19
4.1	PRISOTNOST SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI ENTEROVIRUSOM.....	20
4.1.1	Dokazovanje specifičnih protiteles z metodo Serion elisa classic coxsackievirus za določanje protiteles IgG/IgM/IgA.....	21
4.1.2	Dokazovanje specifičnih protiteles z metodo Serion elisa classic echovirus za določanje protiteles IgG/IgM/IgA.....	22
4.1.3	Dokazovanje specifičnih protiteles z metodo Serion elisa classic enterovirus za določanje protiteles IgG/IgM/IgA.....	23
4.2	PRISOTNOST SPECIFIČNIH RAZREDOV PROTITELES GLEDE NA VRSTO VIRUSA.....	24
4.3	TIP OKUŽBE (AKUTNA, PRETEKLA).....	27
4.4	PRIMERJAVA PARNIH SERUMOV.....	28
4.5	POGOSTOST OKUŽBE S COXSACKIEVIRUSI.....	29
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	30
5.1	RAZLAGA REZULTATOV.....	31
5.2	SKLEPI.....	34
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	36
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	38
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Delež moških in žensk s sumom na virusni miokarditis vključenih v raziskavo ..	19
<b>Slika 2:</b> Grafični prikaz ujemanja rezultatov vzorcev pridobljenih z metodo RVK in ELISA.....	21
<b>Slika 3:</b> Grafični prikaz števila in deleža vzorcev seruma, v katerih so prisotna specifična protitelesa IgG, določena z vsakim od treh uporabljenih testov ELISA (coxsackievirus, echovirus, enterovirus) .....	24
<b>Slika 4:</b> Grafični prikaz števila in deleža vzorcev seruma, v katerih so prisotna specifična protitelesa IgM, določena z vsakim od treh uporabljenih testov ELISA (coxsackievirus, echovirus, enterovirus) .....	25
<b>Slika 5:</b> Grafični prikaz števila in deleža vzorcev seruma, v katerih so prisotna specifična protitelesa IgA, določena z vsakim od treh uporabljenih testov ELISA (coxsackievirus, echovirus, enterovirus) .....	26



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Taksonomska razdelitev enterovirusov (Drinovec, 2007; ICTV, 2010).....	4
<b>Preglednica 2:</b> Vsebina kompleta Serion ELISA classic (Virion/Serion, 2005).....	10
<b>Preglednica 3:</b> Redčenje vzorcev za določanje protiteles IgG (Virion/Serion, 2005) .....	11
<b>Preglednica 4:</b> Redčenje vzorcev za določanje protiteles IgA (Virion/Serion, 2005) .....	11
<b>Preglednica 5:</b> Redčenje absorbenta za faktor Rf (Virion/Serion, 2005).....	11
<b>Preglednica 6:</b> Redčenje vzorcev za določanje protiteles IgM (Virion/Serion, 2005).....	12
<b>Preglednica 7:</b> Shema zapolnjevanja mikrotitrskje ploščice z vzorci seruma pri metodi ELISA.....	12
<b>Preglednica 8:</b> Vrednotenje rezultatov preizkusa Serion ELISA classic za določanje protiteles IgG (Virion/Serion, 2005) .....	14
<b>Preglednica 9:</b> Vrednotenje rezultatov preizkusa Serion ELISA classic za določanje protiteles IgM (Virion/Serion, 2005).....	14
<b>Preglednica 10:</b> Vrednotenje rezultatov preizkusa Serion ELISA classic za določanje protiteles IgA (Virion/Serion, 2005) .....	14
<b>Preglednica 11:</b> Priprava mikrotitrskje ploščice za metodo RVK.....	16
<b>Preglednica 12:</b> Delež vzorcev seruma, ki vsebujejo protitelesa .....	20
<b>Preglednica 13:</b> Ujemanje rezultatov vzorcev seruma z metodo RVK in z metodo ELISA .....	20
<b>Preglednica 14:</b> Število vzorcev seruma s specifičnimi razredi protiteles za coxsackieviruse.....	21
<b>Preglednica 15:</b> Število vzorcev seruma s specifičnimi razredi protiteles za echoviruse ..	22
<b>Preglednica 16:</b> Število vzorcev seruma s specifičnimi razredi protiteles za enteroviruse	23
<b>Preglednica 17:</b> Razdelitev pacientov glede na opredelitev faze okužbe v akutno, preteklo in v stanje brez prisotnosti specifičnih protiteles.....	27
<b>Preglednica 18:</b> Razdelitev pacientov z akutno okužbo glede na spol pri testiranju z metodo ELISA.....	28
<b>Preglednica 19:</b> Primerjava parnih serumov testiranih z metodo RVK in ELISA.....	28
<b>Preglednica 20:</b> Razdelitev vzorcev seruma glede na domnevnega povzročitelja okužbe pri testiranju z metodo ELISA .....	29

## **KAZALO PRILOG**

**Priloga A:** Rezultati testiranja posameznih vzorcev seruma z metodo RVK in z metodo ELISA

## SEZNAM OKRAJŠAV

AK	antikomplementaren
ELISA	encimsko imunska metoda
HCV	hepatitis C virus
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
OG	optična gostota
PCR	verižna reakcija s polimeraz
Rf	revmatoidni faktor
RNA	ribonukleinska kislina
RVK	reakcija vezave komplementa

## 1 UVOD

Enterovirusi spadajo v družino *Picornaviridae* in so med najpogostejšimi patogenimi virusi človeka. Razmnožujejo se predvsem v sluznici črevesja, vendar pa se bolezni izražajo na drugih organskih sistemih, kot so dihala, osrednje živčevje in srčna mišica. Vključeni so lahko v patogenezo resnih kroničnih bolezni srca. Povzročajo lahko miokarditis, perikarditis in kongestivno kardiomiopatijo. Kardiomiopatija je ena najpogostejših srčnih bolezni, ki je posledica infekcijsko povezanega miokarditisa (Maier in sod., 2004). Miokarditis definiramo kot vnetje srčne mišice, ki ga običajno povzročijo virusi, še posebej pogosto prav enterovirusi, ki lahko povzročijo zelo resna klinična stanja, vključno z nenadno srčno smrtjo. Laboratorijska diagnostika okužb je zaradi izredne genetske pestrosti enterovirusov zelo zapletena.

### 1.1 NAMEN

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti ali bi lahko testiranje na protitelesa proti enterovirusom pri bolnikih s sumom na virusni miokarditis, ki se izvaja z metodo reakcije vezave komplementa (RVK), nadomestili s sodobnejšo encimskoimunsko metodo (ELISA). Ugotoviti smo želeli, v kolikšnem odstotku so enterovirusi verjetni povzročitelji virusnega miokarditisa in ali je metoda ELISA bolj primerna za diagnostične namene, kot je metoda RVK.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bomo zaradi večje občutljivosti metode več okužb dokazali z metodo ELISA kot z metodo RVK. Pričakovali smo tudi, da bodo rezultati z metodo ELISA potrdili rezultate predhodno pridobljene z metodo RVK. Predvidevali smo, da bomo v preiskovani skupini bolnikov s sumom na virusni miokarditis, z metodo ELISA največkrat dokazali protitelesa proti coxsackievirusom, ki so najpogosteje opisani kot povzročitelji virusnega miokarditisa.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MIOKARDITIS IN RAZŠIRJENA KARDIOMIOPATIJA

Razširjena kardiomiopatija je bolezen srčne mišice, ki se razvije iz neznanega vzroka (Bolte, 1984). Imunološke raziskave boleznih srčne mišice v zadnjih letih, so zagotovile dokaze, da je bolezen srčne mišice, kjer gre za virusno okužbo, domnevno prva faza razširjene kardiomiopatije (Bolte, 1984). Kardiomiopatija je ena najpogostejših srčnih boleznih, ki je posledica infekcijsko povezanega miokarditisa (Maier in sod., 2004). Miokarditis je pomemben in pogosto neprepoznan vzrok razširjene kardiomiopatije (Schultz in sod., 2009). Definiramo ga kot vnetje srčne mišice, do katerega pride zaradi miokardne infiltracije imunokompetentnih celic, ki so posledica poškodbe miokarda (Kühl in sod., 2009). Klasični miokarditis se večinoma pojavlja kot rezultat gostiteljevega imunskega odziva proti organizmom, ki povzročajo pogoste infekcijske bolezni, kot izraz preobčutljivosti ali kot rezultat toksične reakcije na zdravila (Kühl in sod., 2009). Etiološki dejavniki pri kliničnem miokarditisu so pogosto neidentificirani. Najpogostejši povzročitelji miokarditisa so zelo verjetno enterovirusi, ki lahko povzročijo pri bolnikih klinično zelo resna stanja, vključno z nenadno srčno smrtjo. Skoraj vsak virus je lahko povezan z miokarditisom, vendar pa prevladujejo virusi z RNA genomom, še posebej družina *Picornaviridae*. Najpomembnejši povzročitelji so echovirusi in coxsackievirusi. Slednji zavzemajo prav posebno mesto, saj so odgovorni za tretjino oziroma polovico vseh primerov akutnega miokarditisa in perikarditisa (Romero, 2007). Tu gre predvsem za coxsackieviruse skupine B, prevladujoči serotipi so coxsackievirus B2-B5 (Romero, 2007). Najpogosteje naj bi se pojavljal serotip coxsackievirus B3. Virusno RNA serotipa coxsackievirus B3 lahko odkrijemo v srčni mišici 40-50 % pacientov z razširjeno kardiomiopatijo (Maier in sod., 2004). Večinoma so tarča enterovirusnega miokarditisa novorojenčki, adolescenti in mlajši odrasli. Več kot dve tretjini je moških. Miokarditis zdravijo simptomatsko, bolnik pa mora v akutni fazi bolezni strogo počivati. Ozdravitev je praviloma popolna, vendar pa se lahko konča tudi smrtno. Aktivna bolezen se lahko ponovi, akutni virusni miokarditis lahko občasno napreduje tudi v kronično obliko (Bolte, 1984). Poleg tega obstaja verjetnost, da se kronična kongestivna kardiomiopatija razvije iz asimptomatske okužbe (Bolte, 1984).

Enterovirusi so lahko poleg miokarditisa, perikarditisa in kongestivne kardiomiopatije vključeni v patogenezo še nekaterih drugih resnih kroničnih bolezni, kot je sladkorna bolezen tipa 1 in živčnomišične bolezni (Witsø in sod., 2006). Povzročajo tudi neznačilno vročinsko bolezen, okužbe zgornjih dihal, vročinski izpuščaji, aseptični meningitis, plevrodinijo, encefalitis, akutno paralizo (Witsø in sod., 2006). Določeni serotipi lahko povzročajo tudi spremembe na očeh, kot je akutni hemoragični konjunktivitis, spremembe na koži, pojavijo se lahko bolezni dlani, podplato in ust, hematološke spremembe, kot je akutna infektivna limfocitoza, spremembe na sečilih (orhitis in epididimitis), spremembe mišic in sklepov (artritis in miozitis) ... (Marolt – Gomišček in Radšel – Medvešček, 2002). Velikokrat pa okužbe z enterovirusi potekajo brez simptomov. Ocenjujejo, da je 50-80 % okužb asimptomatskih (Marolt – Gomišček in Radšel – Medvešček, 2002).

## 2.2 ENTEROVIRUSI

### 2.2.1 Splošne značilnosti enterovirusov

Enterovirusi so majhni virusi ikozaedrične oblike, so brez ovojnice, njihov genom je sestavljen iz pozitivno polarne enojnovijačne RNA, ki je sestavljena iz okoli 7400 nukleotidov (Samuelson in sod., 1994). Virusno kapsido sestavljajo kopije strukturnih proteinov VP1, VP2, VP3 in VP4 (Samuelson in sod., 1994). Ime enterovirusi so dobili zaradi sposobnosti podvojevanja v prebavilih, vendar pa v nasprotju s svojim imenom niso ključni povzročitelji gastroenteritisov. Ker nimajo ovojnice, so odporni na eter, etanol, kloroform, nizek pH in neionske detergente. So temperaturno obstojni, optimalno se podvojujejo pri temperaturi 36–37 °C (Romero, 2007). Inaktivira jih temperatura višja od 56 °C (Romero, 2007). So precej stabilni v tekočih okoljih in lahko več tednov preživijo v vodi, telesnih tekočinah in odplakah.

### 2.2.2 Taksonomija

Enteroviruse uvrščamo v družino *Picornaviridae*. Tradicionalni taksonomski kriterij za identifikacijo enterovirusov na nivoju vrste so določili glede na vzorec pomnoževanja posameznega tipa v celičnih kulturah in glede na klinično sliko, ki jo povzročajo (Romero, 2007). Vendar je pozneje prišlo do številnih reklasifikacij. Do sprememb v prvotni klasifikaciji je prišlo zaradi identifikacije novih tipov in razvoja novih celičnih linij, pa tudi

molekularne metode za tipizacijo enterovirusov so dodatno izpodrinile tradicionalne serološke metode za določitev serotipa (Romero, 2007). Tako je bila taksonomija enterovirusov določena na podlagi filogenetske analize, kjer so uporabili kompletno kodirajočo sekvenco strukturnega proteina VP1 (Romero, 2007). S tem so pokazali, da so številni enterovirusi, ki so jih prvotno določili kot posamezne serotipe, pravzaprav isti serotip (Romero, 2007). Po tradicionalni klasifikaciji družina enterovirusov vključuje polioviruse, coxsackieviruse, echoviruse in humane enteroviruse (Samuelson in sod., 1994). Po novi klasifikaciji pa v družino enterovirusov uvrščamo humane enteroviruse A, humane enteroviruse B, humane enteroviruse C in humane enteroviruse D.

**Preglednica 1:** Taksonomska razdelitev enterovirusov (Drinovec, 2007; ICTV, 2010)

<b><u>Tradicionalna klasifikacija</u></b>	<b><u>Nova klasifikacija</u></b>
<b>Poliovirusi</b> (3 serotipi) PV1-PV3	<b>Humani enterovirus A</b> (21 serotipov) <i>Coxsackievirus</i> A2-A8, 10, 12, 14, 16 <i>Enterovirus</i> EV-71, 76, 89, 90, 91, (živalski EV-92, SV19, SV43, SV46, A13)
<b>Coxsackievirusi</b> Skupina A (23 serotipov) A1-A22, A-24 Skupina B (6 serotipov) B1-B6	<b>Humani enterovirus B</b> (59 serotipov) CV-B1-B6, CV-A9 <i>Echovirus</i> E1-E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33 <i>Enterovirus</i> EV-69, EV73-75, EV77-88, EV-93, 97, 98, 100, 101, 106, 107, (živalski SA5)
<b>Echovirusi</b> (28 serotipov) Echo 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33	<b>Humani enterovirus C</b> (19 serotipov) <i>Poliovirus</i> PV1-PV3 <i>Coxsackievirus</i> A-1, 11, 13, 17, A19-22, 24 <i>Enterovirus</i> EV-95, 96, 99, 102, 104, 105, 109
<b>Enterovirusi</b> (4 serotipi) EV 68-71	<b>Humani enterovirus D</b> (3 serotipi) EV-68, EV-70, EV-94

### 2.2.3 Epidemiologija in prenos

Enterovirusi so razširjeni po vsem svetu. Več kot 50 % ne-polio enterovirusnih okužb in več kot 90 % poliovirusnih okužb je subkliničnih (Cohen, 2008). Kadar pa se simptomi

pojavi, se to največkrat kaže kot neznačilna vročinska bolezen, le manjši del okužb je povezan s specifičnimi kliničnimi sindromi (Cohen, 2008). Inkubacijska doba se giblje od 2 do 14 dni, povprečno od 3 do 5 dni (Marolt – Gomišček in Radšel – Medvešček, 2002). Običajno so okužbe pogostejše v okoljih, kjer vladajo slabe socialno-ekonomske razmere in je slaba higiena. V zmernem klimatskem pasu se enterovirusne okužbe najpogosteje pojavljajo poleti in jeseni, za razliko od tropskega podnebja, kjer ni očitnega sezonskega pojavljanja enteroviroz (Cohen, 2008). Največkrat obolevajo dojenčki in otroci do 15. leta starosti. Resna obolenja se najpogosteje razvijejo v prvih dneh življenja in pri starejših otrocih ter mlajših odraslih.

Večinoma se enterovirusi prenašajo po fekalno-oralni poti, preko onesnaženih rok in predmetov (Cohen, 2008). Oboleli so najbolj kužni v kratkem obdobju pred in po izbruhu bolezenskih simptomov, ko je virus prisoten v iztrebku in žrelu (Cohen, 2008). Poleti so lahko izvor okužbe predvsem plavalni bazeni in kopalne vode. Vzrok okužbe je lahko tudi kontaminirana hrana in voda. Določeni enterovirusi, kot je na primer enterovirus 70, ki povzroča akutni hemoragični konjunktivitis, se lahko prenaša preko neposrednega stika kontaminiranih prstov z očesom (Cohen, 2008). Prenos preko kužnih kapljic je pomemben pri virusih, ki povzročajo okužbe dihal, eden takšnih je coxsackievirus A21 (Cohen, 2008). Enterovirusi se lahko prenašajo tudi preko placente iz matere na zarodek, kar lahko povzroči resno bolezen pri novorojenčku (Cohen, 2008).

#### **2.2.4 Diagnostika enterovirusnega miokarditisa**

Diagnostika miokarditisa je na splošno precej zapletena, ločevanje od ostalih srčnih bolezni, ki lahko povzročajo podobne klinične simptome, je zelo pomembno. Obstajajo neinvazivne in invazivne diagnostične tehnike. Pri neinvazivnih tehnikah se poslužujemo EKG-preiskave, ki pri polovici pacientov z miokarditisom pokaže dvignjen S-T segment ali neznačilne spremembe S-T in T valov (Marolt – Gomišček in Radšel – Medvešček, 2002). Lahko se pojavijo valovi Q, ventrikularna tahiaritmija in vse stopnje srčnega bloka. Med invazivne tehnike pa štejemo predvsem histološke in imunohistološke preiskave, ki zahtevajo žilno kateterizacijo bolnika. Sledijo molekularno-biološke metode za dokaz virusa in serološke preiskave za dokaz specifičnih protiteles.



Diagnostika enterovirusnega miokarditisa je zahtevna zaradi izredne genetske pestrosti enterovirusov, ki zapleta laboratorijske postopke, tako pri posrednih kot tudi neposrednih viroloških metodah. Za pravilno etiološko diagnozo miokarditisa trenutno ni na voljo optimalnih metod. Kadar sumimo, da gre za enterovirusni miokarditis se poslužujemo predvsem seroloških preiskav, kot sta metodi RVK in ELISA. Diagnozo pa lahko potrdimo tudi z molekularno-biološkimi metodami, kot je npr. PCR, z osamitvijo virusa iz perikardialnega eksudata ali srčne mišice, iz žrela ali blata.

#### 2.2.4.1 Serološke metode

Serološka diagnostika enterovirusnih okužb je zapletena zaradi velikega števila enterovirusnih serotipov in pomanjkanja skupnih antigenov (Cohen, 2008). Z metodo RVK lahko dokazujemo protitelesa proti coxsackievirusom A9, B1-B6 in echovirusom, vendar ne moremo dokazovati posameznih razredov protiteles. Za določanje posameznih razredov protiteles proti enterovirusom uporabljamo metodo ELISA, ki je na voljo za najpogostejše serotipe v komercialnih kitih in lahko dokazujemo prisotnost protiteles IgG, IgA in IgM.

Težava, ki se pojavi, je tudi, da je značilen porast titra protiteles pri pacientih s sumom na miokarditis zaznan le občasno. To lahko pripišemo temu, da se težave na srcu pri pacientih pokažejo pozno v poteku okužbe. Laboratorijska diagnostika tako predvsem temelji na prisotnosti visokih titrov protiteles.

##### 2.2.4.1.1 RVK

Reakcija vezave komplementa je ena najstarejših metod za dokazovanje protiteles v serumu, vendar pa z njo ne moremo ločiti posameznih razredov protiteles.

Za izvedbo RVK metode potrebujemo dva ločena indikatorska sistema, in sicer indikatorski (hemolitični) sistem, ki ga sestavljajo ovčji eritrociti, kunčja protitelesa IgG proti ovčjim eritrocitom (hemolizin) in komplemet (serum budre) ter testni sistem, ki ga sestavljata virusni antigen in serum, v katerem ugotavljamo protitelesa (Avšič Županc, 2007). Sestavine indikatorskega sistema moramo zmešati v najugodnejši koncentraciji, da se hemolizin veže na površino ovčjih eritrocitov, na nastali kompleks se veže še komplemet, ki razkroji eritrocite (Avšič Županc, 2007). Komplemet je encimska komponenta krvi, ki jo aktivira prisotnost kompleksov antigen – protitelo (Virion/Serion,

2009a). Komplement lahko aktivirajo samo IgG<sub>1</sub>-, IgG<sub>2</sub>-, IgG<sub>3</sub>- in IgM-antigen-kompleksi. Izvedba testa poteka v dveh fazah. Najprej reagirajo virusni antigen, serumska protitelesa in komplement, ki se veže na Fc del protiteles (Avšič Županc, 2007). Če v preiskovanem serumu ni specifičnih protiteles, ostane komplement nevezan, zato se v drugi fazi, ob dodatku indikatorskega sistema, le-ta aktivira ob vezavi na imunski kompleks hemolizina in ovčjih eritrocitov, česar posledica je hemoliza eritrocitov (Avšič Županc, 2007). Aktiviran komplement napade membrane eritrocitov in jih uniči. Hemoliza eritrocitov pomeni, da v serumu ni specifičnih protivirusnih protiteles in je rezultat testa negativen. V primeru prisotnosti protiteles ostanejo eritrociti nepoškodovani in se sesedejo na dno mikrotitracijske ploščice v obliki eritrocitnega gumba, kar pomeni, da je rezultat testa pozitiven.

Z RVK testom ugotavljamo vezavo komplementa na IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> in IgM protitelesa proti coxsackievirusom A9, B1-B6 in echovirusom. Če za analizo nimamo na voljo parnega seruma pacienta, iz rezultatov testiranja ne moremo sklepati za kakšno okužbo gre (akutna okužba, nedavna oziroma pretekla okužba ali kronična okužba) (Virion/Serion, 2009a). Zaradi tega, ker s testom RVK ne moremo določati posameznih razredov protiteles, je ponovno testiranje parnega seruma nujno, da lahko opredelimo za kakšno okužbo gre (Virion/Serion, 2009a). Za zanesljivo interpretacijo je potreben parni serum, ki je odvzet v razmiku 5-7 dni. Štirikratni porast titra protiteles parnega seruma je znak za akutno okužbo, visoki titri protiteles v obeh paralelkah pa nakazujejo na nedavno ali kronično infekcijo (Virion/Serion, 2009a). Za natančnejšo določitev ali gre za akutno ali preteklo okužbo, je potrebna analiza z bolj natančnimi metodami, s specifičnimi IgG-, IgM- testi (Virion/Serion, 2009a). Padanje titra v parnih serumih pa nakazuje na to, da gre že za okrevanje po nedavni okužbi. Glede na značilnosti testa RVK je le-tega primerno uporabljati kot presejalni test za akutne okužbe (Virion/Serion, 2009a). Odsotnost protiteles pri določanju s testom RVK ne izključuje možnosti akutne okužbe. Za določitev serološkega statusa (zaščitna protitelesa, pretekla okužba) RVK test ni primeren, takrat moramo uporabiti dodatne teste, npr. ELISA. Po navedbah proizvajalca Virion/Serion v Nemčiji od leta 2007 dokazovanje protiteles proti poliovirusu in drugim enterovirusom z metodo RVK ni več akreditirana preiskava.

#### 2.2.4.1.2 ELISA

ELISA je imusko encimska metoda, ki jo uporabljamo za dokazovanje protiteles ali antigenov v vzorcu. Za določanje protiteles v vzorcu uporabljamo indirektno metodo ELISA, direktna ELISA pa je prirejena za določanje antigenov. Pri metodi ELISA za določanje protiteles v vzorcu, imamo na trden nosilec, ki je najpogosteje polistirenska mikrotitracijska ploščica z vdolbinicami, vezan ustrezen virusni antigen (Avšič Županc, 2007). V vdolbinice dodamo serum in po inkubaciji spiramo, nato dodamo sekundarna protitelesa, ki so označena z encimom in se vežejo na nastale komplekse antigena in serumskih protiteles. Po inkubaciji ponovno spiramo, da se znebimo nevezanih sekundarnih protiteles in dodamo ustrezen substrat. Glede na količino razgrajenega substrata, ki jo določimo spektrofotometrično, sklepamo na količino protiteles v serumu.

Metoda ELISA je med vsemi serološkimi metodami najbolj uporaben diagnostični test, saj je visoko specifična in občutljiva metoda, s katero lahko poleg protiteles IgG dokaj hitro in zanesljivo določimo tudi protitelesa IgM in IgA, ki so pomembni kazalci akutne okužbe (Avšič Županc, 2007). Metoda je lahko kvalitativna ali kvantitativna.

### 3 MATERIALI IN METODE

Raziskavo smo izvajali na arhivskih serumih bolnikov, ki so bili v letu 2009 poslani v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, na redno diagnostiko zaradi suma na virusni miokarditis. Pri redni diagnostiki so bili vzorci testirani z metodo RVK, ki je v okviru diplomske naloge nismo ponovno izvajali. Vse vzorce smo dodatno testirali z metodo ELISA z devetimi različnimi testi proizvajalca Virion/Serion.

V okviru diplomskega dela smo uporabili naslednje komercialne teste:

- Virion/Serion CFT (reagenti za izvedbo RVK). Uporabljeni antigeni so coxsackievirus A9, coxsackievirus B1-B6 in echo-pool.
- Serion Elisa Classic Enterovirus za določanje specifičnih protiteles IgG/IgM/IgA. Komplet kot antigensko komponento vsebuje toplotno inaktivirane virione echovirusa 6 in coxsackievirusa B5.
- Serion Elisa Classic Coxsackievirus za določanje specifičnih protiteles IgG/IgM/IgA. Komplet kot antigensko komponento vsebuje toplotno inaktivirane virione coxsackievirusa B1 in coxsackievirusa B6.
- Serion Elisa Classic Echovirus za določanje specifičnih protiteles IgG/IgM/IgA. Komplet kot antigensko komponento vsebuje toplotno inaktivirane virione echovirusa E6 in echovirusa E9.

### 3.1 METODA ELISA

Vsi testi proizvajalca Virion/Serion se izvajajo po enakem principu, ne glede na antigene, ki jih vsebujejo. Zato smo princip testa za izvedbo opisali samo enkrat.

#### 3.1.1 Vsebina kompleta

**Preglednica 2:** Vsebina kompleta Serion ELISA classic (Virion/Serion, 2005)

<b>Preizkusne komponente</b>	<b>količina/ prostornina</b>
<b>Trakovi za mikrotitriranje, ki jih lahko ločimo; v vsakem je 8 enojnih vdolbinic, obloženih z antigenom (skupaj 96) MTP</b> 1 okvir material za oblogo je inaktiviran	12
<b>Standardni serum (pripravljen za uporabo) STD</b> Človeški serum v fosfatnem pufru z beljakovinami, negativen za protitelesa proti virusu HIV, površinskemu antigenu za virus hepatitisa B (HBs-Ag) in protitelesa proti virusu HCV; KONZERVANS: < 0,1-odstotni natrijev azid BARVILO: amaranth O	2 x 2 ml
<b>Serum za negativno kontrolo (pripravljen za uporabo) NEG</b> Človeški serum v fosfatnem pufru z beljakovinami, negativen za protitelesa proti virusu HIV, površinskemu antigenu za virus hepatitisa B (HBs-Ag) in protitelesa proti virusu HCV; KONZERVANS: < 0,1-odstotni natrijev azid BARVILO: lissamin zeleno V	2 ml
<b>Konjugat proti človeškim protitelesom IgG, IgM ali IgA (pripravljen za uporabo) APC</b> Konjugat proti človeškim protitelesom IgG, IgA in IgM, pridobljen iz koz (poliklonalen), vezan na alkalno fosfatazo, stabiliziran z raztopino za stabilizacijo beljakovin; KONZERVANS: 0,01-odstotni metilizotiazolon, 0,01-odstotni bromnitrodioksan	13 ml
<b>Koncentrat raztopine za izpiranje (zadostuje za 1000 ml) WASH</b> raztopina natrijevega klorida s Tween 20, 30 mM Tris; KONZERVANS: < 0,1-odstotni natrijev azid	33,3 ml
<b>Pufer za redčenje DILB</b> Fosfatni pufer z beljakovinami in Tween 20; KONZERVANS: < 0,1-odstotni natrijev azid 0,01 g/l natrijeva sol bromfenol modrega	2 x 50 ml
<b>Raztopina za ustavitev reakcije STOP</b> 1,2 N natrijev hidroksid	15 ml
<b>Substrat (pripravljen za uporabo) pNPP</b> Para-nitrofenilfosfat, pufer brez topila KONZERVANS: < 0,1-odstotni natrijev azid (Substrat v neodprti steklenici je rahlo rumene barve. To ne zmanjša kakovosti proizvoda!)	13 ml
<b>Certifikat o nadzoru kakovosti s standardno krivuljo in tabelo ocenitve INFO</b> (količina protiteles, izražena v IE/ml ali E/ml)	1

### 3.1.2 Priprava vzorcev za metodo ELISA

Pred izvedbo preizkusa smo vzorce bolnikov (V1) razredčili v pufru za redčenje (V2), kar prikazujeta preglednici 3 in 4.

**Preglednica 3:** Redčenje vzorcev za določanje protiteles IgG (Virion/Serion, 2005)

V1 + V2 = 1 + 500	dodamo po	10 µl	seruma bolnika
	v	1000 µl	pufra za redčenje (=1 + 100)
		50 µl	prve razredčitve
	v	200 µl	pufra za redčenje (=1 + 4)

**Preglednica 4:** Redčenje vzorcev za določanje protiteles IgA (Virion/Serion, 2005)

V1 + V2 = 1 + 100	dodamo po	10 µl	seruma bolnika
	v	1000 µl	pufra za redčenje

Za določanje protiteles IgM smo morali vzorce obdelati z absorbentom za revmatoidni faktor, saj bi lahko ob morebitni prisotnosti revmatoidnega faktorja dobili lažno pozitivne rezultate. Najprej smo absorbent za revmatoidni faktor (V1) redčili v pufru za redčenje (V2), kar prikazuje preglednica 5.

**Preglednica 5:** Redčenje absorbenta za faktor Rf (Virion/Serion, 2005)

V1 + V2 = 1 + 4	dodamo po	200 µl	absorbenta za faktor Rf
	v	800 µl	pufra za redčenje

Vzorce bolnikov (V4) smo redčili v pufru za redčenje s faktorjem Rf (V3), kar prikazuje preglednica 6.

**Preglednica 6:** Redčenje vzorcev za določanje protiteles IgM (Virion/Serion, 2005)

V4 + V3 = 1 + 100	dodamo po	10 µl	seruma bolnika
	v	1000 µl	pufra za redčenje s faktorjem Rf

### 3.1.3 Preizkusni postopek

Ko smo vzorce ustrezno redčili, smo jih pred vnosom v vdolbinice na mikrotitrskih ploščah dobro premešali, da smo dobili homogeno raztopino. V ustrezne vdolbinice smo dodali po 100 µl redčenega vzorca ali kontrole. Eno vdolbinico smo prihranili za slep substrat.

**Preglednica 7:** Shema zapolnjevanja mikrotitrskeske ploščice z vzorci seruma pri metodi ELISA

	Kvantitativni preizkus protiteles IgG			Kvantitativni preizkus protiteles IgM			Kvantitativni preizkus protiteles IgA		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	slep substrat	vzorec 5	vzorec 13	slep substrat	vzorec 5	vzorec 13	slep substrat	vzorec 5	vzorec 13
B	neg. kontrola	vzorec 6	vzorec 14	neg. kontrola	vzorec 6	vzorec 14	neg. kontrola	vzorec 6	vzorec 14
C	standardni serum	vzorec 7	vzorec 15	standardni serum	vzorec 7	vzorec 15	standardni serum	vzorec 7	vzorec 15
D	standardni serum	vzorec 8	vzorec 16	standardni serum	vzorec 8	vzorec 16	standardni serum	vzorec 8	vzorec 16
E	vzorec 1	vzorec 9	vzorec 17	vzorec 1	vzorec 9	vzorec 17	vzorec 1	vzorec 9	vzorec 17
F	vzorec 2	vzorec 10	vzorec 18	vzorec 2	vzorec 10	vzorec 18	vzorec 2	vzorec 10	vzorec 18
G	vzorec 3	vzorec 11	vzorec 19	vzorec 3	vzorec 11	vzorec 19	vzorec 3	vzorec 11	vzorec 19
H	vzorec 4	vzorec 12	vzorec 20	vzorec 4	vzorec 12	vzorec 20	vzorec 4	vzorec 12	vzorec 20

Nato smo vzorce inkubirali 60 minut (+/- 5 min) pri 37 °C (+/- 1 °C) v vlažni komori. Po inkubaciji smo vse vdolbinice izprali z raztopino za izpiranje po sledečem postopku:

- izsesamo ali odtresemo raztopino za inkubacijo,

- ▶ vse vdolbinice napolnimo s 300  $\mu$ l raztopine za izpiranje,
- ▶ izsesamo ali odtresemo pufer za izpiranje,
- ▶ postopek izpiranja ponovimo trikrat,
- ▶ posušimo ploščo za mikroteste tako, da jo rahlo pretrkamo ob papirnato brisačo.

Nato dodamo 100  $\mu$ l konjugata IgG/IgM/IgA v ustrezne vdolbinice, razen v slep substrat, in plošče inkubiramo 30 min (+/- 1 min) pri 37 °C (+/- 1 °C) v vlažni komori. Po inkubaciji ponovimo postopek izpiranja z raztopino za izpiranje. Nato v vse vdolbinice dodamo 100  $\mu$ l substrata in ponovno inkubiramo 30 min (+/- 1 min) pri 37 °C (+/- 1 °C) v vlažni komori. Po 30 minutah reakcijo ustavimo z dodatkom 100  $\mu$ l raztopine za ustaveitev reakcije v vse vdolbinice in premešamo tako, da nežno pretresemo mikrotitrsko ploščo. Na koncu izmerimo optično gostoto (OG) pri valovni dolžini 405 nm in glede na optično gostoto na podlagi standardne krivulje dobimo ustrezno aktivnost protiteles.

### 3.1.4 Vrednotenje preizkusa

#### Pogoji veljavnosti:

- ▶ slepi substrat mora imeti OG < 0,25,
- ▶ negativna kontrola mora biti negativna,
- ▶ kvantitativni test ELISA: srednja vrednost OG standardnega seruma mora biti znotraj območja veljavnosti, ki ga določa certifikat nadzora kakovosti, specifičen za serijo tega kompleta (po odštetju slepega substrata),
- ▶ kvalitativni test ELISA: srednja vrednost OG pozitivne kontrole mora biti znotraj območja veljavnosti, ki ga določa certifikat nadzora kakovosti, specifičen za serijo tega kompleta (po odštetju slepega substrata),
- ▶ odstopanja OG vrednosti ne smejo biti večja od 20 %.

Če ti pogoji niso izpolnjeni je potrebno test ponoviti.



### Vrednotenje rezultatov:

**Preglednica 8:** Vrednotenje rezultatov preizkusa Serion ELISA classic za določanje protiteles IgG (Virion/Serion, 2005)

pozitivni izvid:	> 100 E/ml
mejni izvid:	80-100 E/ml
negativni izvid:	< 80 E/ml

Da izvid opredelimo kot pozitiven na prisotnost protiteles IgG, mora biti v serumu prisotnih več kot 100 E/ml. Mejni izvid pomeni, da je v serumu 80-100 E/ml. Izvid je negativen, če je v serumu manj kot 80 E/ml.

**Preglednica 9:** Vrednotenje rezultatov preizkusa Serion ELISA classic za določanje protiteles IgM (Virion/Serion, 2005)

pozitivni izvid:	> 50 E/ml
mejni izvid:	30-50 E/ml
negativni izvid:	< 30 E/ml

Izvid je pozitiven na prisotnost protiteles IgM, če je v serumu prisotnih več kot 50 E/ml. Mejni izvid pomeni, da je v serumu 30-50 E/ml. Da lahko rečemo, da je izvid negativen mora, biti v serumu manj kot 30 E/ml.

**Preglednica 10:** Vrednotenje rezultatov preizkusa Serion ELISA classic za določanje protiteles IgA (Virion/Serion, 2005)

pozitivni izvid:	> 50 E/ml
mejni izvid:	30-50 E/ml
negativni izvid:	< 30 E/ml

Pri določanju protiteles IgA rezultate vrednotimo enako kot pri določanju protiteles IgM. Izvid je pozitiven, če je v serumu prisotnih več kot 50 E/ml. Mejni izvid pomeni, da je v serumu 30-50 E/ml. Da lahko rečemo, da je izvid negativen, mora biti v serumu manj kot 30 E/ml.

## 3.2 METODA RVK

### 3.2.1 Vsebina kompleta virion/serion RVK

- antigen/kontrolni antigen,
- pozitivna in negativna kontrola,
- komplement,
- amboceptor,
- veronalni pufer,
- eritrociti,
- hemolitični sistem.

### 3.2.2 Priprava vzorcev za metodo RVK

Vzorci seruma najprej razredčimo, 100 µl pacientovega seruma razredčimo v 900 µl veronalnega pufera. Nato inkubiramo 30 minut na 56 °C v vodni kopeli, da uničimo endogeni komplement. Razredčen serum lahko zaprt hranimo en teden pri temperaturi 2-8 °C. Pred vsakim testiranjem moramo takšen serum ponovno inaktivirati za 10 minut pri 56 °C.

### 3.2.3 Postopek priprave seruma za ugotovitev antikomplementarne aktivnosti

Nekateri serumi lahko pokažejo antikomplementarno aktivnost, kar se lahko pokaže kot lažno pozitiven rezultat. Antikomplementarno aktivnost dokažemo z uporabo kontrolnega seruma. Kontrolni serum pripravimo tako, da ne dodamo antigena v mikrotitrsko jamico. Kontrolni serum pripravimo za vsak serumski vzorec. Do antikomplementarne aktivnosti pride zaradi agregacije protiteles, ki so posledica ponavljajočega se zamrzovanja in odtajanja seruma, hemolitičnega ali kontaminiranega seruma, kot tudi revmatoidnega faktorja v serumu, krožečih imunskih kompleksov ali zdravil. Kontrolni serum pripravimo tako, da ga zmešamo s komplementom v razmerju 1:1. Zmešamo 100 µl seruma in 100 µl komplementa, inkubiramo 30 minut pri 37 °C v vodni kopeli ali 60 minut na sobni

temperaturi, dodamo 800  $\mu$ l veronalnega pufru in inkubiramo 30 minut pri 56 °C v vodni kopeli. Dobimo serum, ki je zredčen v razmerju 1:10 in ga lahko uporabimo za testiranje.

### 3.2.4 Preizkusni postopek

#### Prvi dan

Uporabimo mikrotitrne ploščice. Za vsak antigen uporabimo pozitivno in negativno kontrolo, če se odločimo za uporabo kontrolnega antigena, moramo serum analizirati v dveh paralelkah. Antigeni, ki so pridobljeni iz inficiranih celic, vsebujejo komponente tkivnih celic (ovojnice nekaterih virusov so npr. sestavljene iz komponent gostiteljskih celic). Nekateri serumi vsebujejo protitelesa, ki so uperjena proti tem komponentam tkivnih celic, česar posledica so lahko lažno pozitivni rezultati. Za dokaz teh nespecifičnih reakcij uporabimo kontrolni antigen, ki ga pridobimo iz neinficiranih celic, ki so pripravljene na enak način kot inficirane celice.

**Preglednica 11:** Priprava mikrotitrne ploščice za metodo RVK

titer	preizkusni postopek z antigenom						preizkusni postopek s kontrolnim antigenom					
	KS	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	KS	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
št. vdolbinice	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
poz. - kontrola												
neg. - kontrola												
pacient 1												
pacient 2												
pacient 3												
pacient 4												
itd.												
kontrolni komplement		2	1	0.5	0.25			2	1	0.5	0.25	

KS = kontrolni serum

#### Postopek priprave seruma in kontrolnega seruma:

- dodamo 25  $\mu$ l veronalnega pufru v vdolbinico 1 in v vdolbinice od številke 3 do 6,

- ▶ pipetiramo 25  $\mu$ l rečenega seruma v vdolbinice 1, 2 in 3 ter nato pripravimo titer po naslednjem postopku: začnemo z vdolbinico 3 in prenesemo 25  $\mu$ l v naslednjo vdolbinico, iz te vdolbinice zopet v naslednjo vse do vdolbinice 6, iz 6. vdolbinice odstranimo 25  $\mu$ l,
- ▶ pipetiramo 25  $\mu$ l delovne raztopine antigena oz. kontrolnega antigena v vdolbinice 2 do 6, vdolbinico 1 spustimo za kontrolo antikomplementarne aktivnosti,
- ▶ v vdolbinice 1 do 6 pipetiramo 25  $\mu$ l komplementa.

#### Postopek priprave kontrolnega komplementa:

- ▶ RVK pufer pipetiramo v vdolbinice 3, 4 in 5 v vrstici za kontrolni komplement,
- ▶ pipetiramo 25  $\mu$ l delovne raztopine komplementa v vdolbinici 2 in 3 ter nato iz vdolbinice 3 prenesemo 25  $\mu$ l v naslednjo vdolbinico in tako iz vsake naslednje naprej prenašamo do vdolbinice 5,
- ▶ pipetiramo 25  $\mu$ l antigena in RVK pufru v vdolbinice 2 do 5.

Na koncu ploščico pokrijemo in inkubiramo 16–20 ur na 2–8 °C.

### **Drugi dan**

#### Priprava hemolitičnega sistema:

- ▶ hemolitični sistem pripravimo tako, da zmešamo delovno raztopino amboceptorja z 1 % eritrocitno suspenzijo. Pred tem sediment eritrocitov previdno premešamo, da dobimo homogeno suspenzijo. Nato inkubiramo 30 minut pri 37 °C v vodni kopeli.

#### Obdelava mikrotitrskih ploščic iz prvega dneva:

- ▶ mikrotitrške ploščice grejemo v inkubatorju 30 minut pri temperaturi 37 °C,
- ▶ v vsako vdolbinico odpipetiramo 50  $\mu$ l sveže pripravljene hemolitičnega sistema in previdno potresemo ploščice,

- ▶ inkubiramo v inkubatorju pri 37 °C 15-30 minut,
- ▶ po 15 minutah preverimo hemolizo,
- ▶ inkubacijo ustavimo, ko kontrolni komplement v vdolbinici 2 in 3 popolnoma hemolizira. Mikrotitrne ploščice centrifugiramo 5 minut pri 2000 rpm pri temperaturi 4 °C in rezultate odčitamo v naslednjih 30-60 minutah po centrifugiranju.

### **3.2.5 Interpretacija rezultatov**

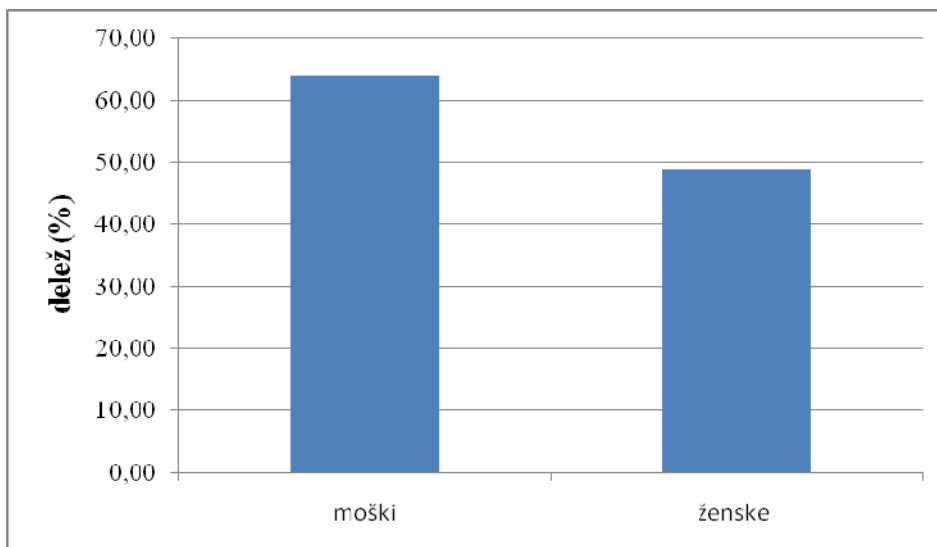
100 % ali 75 % hemoliza eritrocitov pomeni, da v serumu ni specifičnih protivirusnih protiteles. 50 ali manj % hemoliza pa pomeni, da so protitelesa prisotna. V primeru prisotnosti protiteles ostanejo eritrociti nepoškodovani in se sesedejo na dno mikrotitracijske ploščice v obliki eritrocitnega gumba. Rezultat testa na prisotnost protiteles proti coxsackievirusom A9, B1-B6 in echovirusom interpretiramo kot pozitiven, če je eritrocitni gumb prisoten pri titru 1:20 ali več. V Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij Inštituta za mikrobiologijo Univerze v Ljubljani vzorce testirane z metodo RVK redčijo do največjega titra 1:160, kar je tudi največja vrednost, ki jo sporočajo v končnem izvidu. V vzorcih se lahko pojavi antikomplementarna aktivnost, kar pomeni, da so lahko v vzorcih prisotne komponente, ki ovirajo delovanje in vezavo komplementa na kompleks antigen protitelo. Rezultate testa RVK, ki so pokazali antikomplementarno aktivnost, smo opredelili za negativne.

#### Kriteriji validacije testa:

- ▶ negativna kontrola mora biti negativna, prisotna mora biti kompletna hemoliza,
- ▶ pri pozitivni kontroli ne smemo imeti prisotne hemolize,
- ▶ kontrolni serum mora biti negativen (kompletna hemoliza), v nasprotnem primeru je prisotna antikomplementarna aktivnost,
- ▶ pri kontrolnem komplementu mora biti pri enotah 2 in 1 prisotna kompletna hemoliza, pri enotah 0.5 in 0.25 pa šibka hemoliza oz. odsotnost hemolize.

#### 4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 133 serumskih vzorcev bolnikov s sumom na virusni miokarditis. Od tega je bilo 20 parnih serumov, torej je bilo v analizo vključenih 113 pacientov. Vključili smo paciente, ki so bili starejši od 10 let in mlajši od 65 let, mediana starosti pacientov je znašala 39 let. Število moških vključenih v raziskavo je bilo 64, število žensk vključenih v raziskavo pa 49. 16 parnih serumov je pripadalo moškim, 4 parni serumi pa ženskam.



**Slika 1:** Delež moških in žensk s sumom na virusni miokarditis vključenih v raziskavo

Rezultati testiranja so prikazani v preglednicah. Mejni rezultat, določen z metodo ELISA, smo interpretirali kot negativen izvid. Pri pacientih, kjer smo imeli na voljo parna seruma, smo jih interpretirali kot pozitivne na okužbo, če smo vsaj v enem od preiskovanih serumov dokazali specifična protitelesa kateregakoli razreda. Podobno smo interpretirali fazo okužbe, kjer smo kot akutno okužbo upoštevali, če smo vsaj pri enem od testiranih serumov z metodo ELISA dokazali protitelesa razredov IgA ali IgM.

Na akutno okužbo smo sklepali na podlagi dokaza specifičnih protiteles IgM in/ali IgA ali iz naraščajočega titra protiteles IgG pri testiranju z metodo ELISA. Na preteklo okužbo smo sklepali, kadar so bila v serumu pristona izključno specifična protitelesa razreda IgG.

#### 4.1 PRISOTNOST SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI ENTEROVIRUSOM

**Preglednica 12:** Delež vzorcev seruma, ki vsebujejo protitelesa

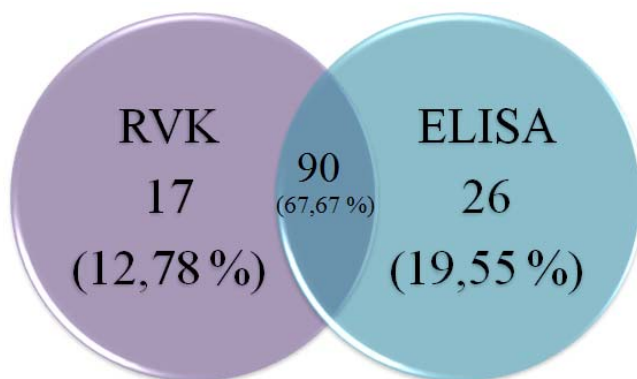
	<b>RVK</b>	<b>ELISA</b>
<b>vzorci, ki vsebujejo protitelesa</b>	73 (54.89 %)	82 (61.15 %)

Preglednica 12 prikazuje število in delež vzorcev, ki so vsebovali specifična protitelesa, ki smo jih dokazali z metodo RVK ali z metodo ELISA. Pri metodi ELISA smo upoštevali kot dokaz za prisotnost specifičnih protiteles pozitiven rezultat, pri kateremkoli izmed uporabljenih testov (enterovirus IgG, IgM, IgA, echovirus IgG, IgM, IgA ali coxsackievirus IgG, IgM, IgA). Ugotovili smo, da je bilo z metodo RVK izmed 133 kliničnih vzorcev 73 takšnih, ki so vsebovali protitelesa, kar znaša 54,89 %, z metodo ELISA pa smo protitelesa dokazali v 82 vzorcih, kar znaša 61,15 %.

**Preglednica 13:** Ujemanje rezultatov vzorcev seruma z metodo RVK in z metodo ELISA

		<b>RVK</b>	
		poz. vzorci	neg. vzorci
<b>ELISA</b>	poz. vzorci	56	26
	neg. vzorci	17	34

Preglednica 13 prikazuje vzorce, kjer se interpretacija rezultatov ujema in vzorce, kjer se interpretacija glede na izbrani test razlikuje. Vzorcev, v katerih smo z obema metodama dokazali specifična protitelesa, je bilo 56. Vzorcev, pri katerih specifičnih protiteles nismo dokazali, pa je bilo 34. V 26 vzorcih smo specifična protitelesa dokazali le z metodo ELISA. V 17 vzorcih smo specifična protitelesa dokazali le z metodo RVK.



**Slika 2:** Grafični prikaz ujemanja rezultatov vzorcev pridobljenih z metodo RVK in ELISA

Od 133 preiskovanih vzorcev se rezultati testiranja z obema metodama ujemajo v 90 vzorcih, kar pomeni, da smo ugotovili 67,67 % ujemanje med metodama. 17 vzorcev oziroma 12,78 % je takšnih, kjer smo protitelesa dokazali le z metodo RVK in 26 takih, kjer smo protitelesa dokazali le z metodo ELISA. Skupno neujemanje rezultatov je torej 32,33 %.

#### 4.1.1 Dokazovanje specifičnih protiteles z metodo Serion elisa classic coxsackievirus za določanje protiteles IgG/IgM/IgA

**Preglednica 14:** Število vzorcev seruma s specifičnimi razredi protiteles za coxsackieviruse

	št. vzorcev, v katerih so prisotna specif. protitelesa
Cox IgG+, IgM+, IgA+	0
Cox IgG+, IgM+, IgA-	1
Cox IgG+, IgM-, IgA+	7
Cox IgG+, IgM-, IgA-	33
Cox IgG-, IgM+, IgA+	3
Cox IgG-, IgM+, IgA-	3
Cox IgG-, IgM-, IgA+	16

Preglednica 14 prikazuje število vzorcev, glede na dokazane razrede specifičnih protiteles. Ugotovili smo, da smo pri dokazovanju protiteles z metodo Serion elisa classic coxsackievirus za določanje protiteles IgG/IgM/IgA največkrat dokazali samo protitelesa IgG, takšnih serumskih vzorcev je bilo 33. V enem vzorcu smo ugotovili prisotnost specifičnih protiteles IgG in IgM. V 7 vzorcih smo dokazali specifična protitelesa IgG in IgA proti coxsackievirusom, v 3 vzorcih smo ugotovili hkratno prisotnost specifičnih



protiteles IgM in IgA, prisotnost zgolj specifičnih protiteles IgM smo dokazali v 3 vzorcih, v 16 vzorcih pa so bila prisotna samo protitelesa IgA. V nobenem vzorcu pa nismo dokazali prisotnosti vseh treh razredov protiteles hkrati.

#### 4.1.2 Dokazovanje specifičnih protiteles z metodo Serion elisa classic echovirus za določanje protiteles IgG/IgM/IgA

**Preglednica 15:** Število vzorcev seruma s specifičnimi razredi protiteles za echoviruse

	št. vzorcev, v katerih so prisotna specif. protitelesa
Echo IgG+, IgM+, IgA+	0
Echo IgG+, IgM+, IgA-	1
Echo IgG+, IgM-, IgA+	5
Echo IgG+, IgM-, IgA-	34
Echo IgG-, IgM+, IgA+	0
Echo IgG-, IgM+, IgA-	1
Echo IgG-, IgM-, IgA+	17

Preglednica 15 prikazuje število vzorcev, v katerih so prisotna specifična protitelesa razredov IgG, IgM in IgA. Ugotovili smo, da smo pri dokazovanju protiteles z metodo Serion elisa classic echovirus največkrat dokazali samo prisotnost specifičnih protiteles IgG, takšnih serumskih vzorcev je bilo 34. V enem vzorcu smo dokazali specifična protitelesa IgG in IgM. V 5 vzorcih smo ugotovili sočasno prisotnost specifičnih protiteles IgG in IgA. V nobenem vzorcu nismo dokazali, da bi bila hkrati prisotna specifična protitelesa IgM in IgA. Prav tako nismo v nobenem vzorcu dokazali prisotnosti vseh treh razredov specifičnih protiteles hkrati. Prisotnost zgolj specifičnih IgM protiteles smo dokazali v enem vzorcu, v 17 vzorcih pa so bila prisotna samo specifična protitelesa IgA.

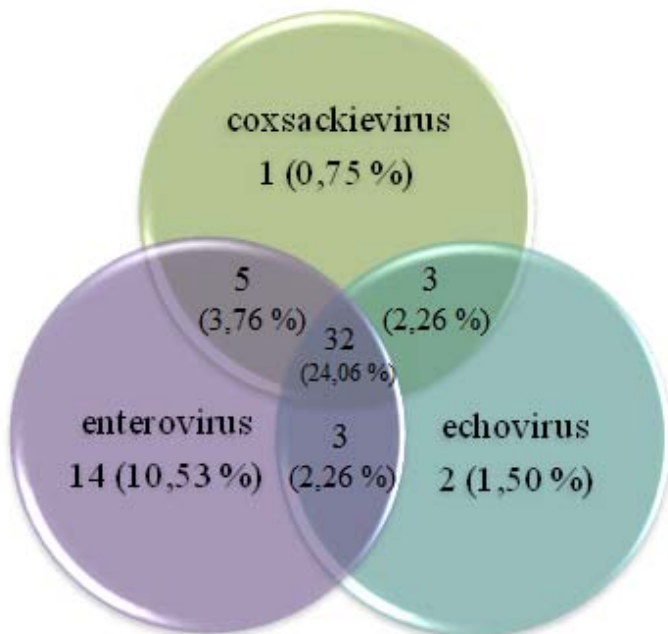
### 4.1.3 Dokazovanje specifičnih protiteles z metodo Serion elisa classic enterovirus za določanje protiteles IgG/IgM/IgA

**Preglednica 16:** Število vzorcev seruma s specifičnimi razredi protiteles za enteroviruse

	št. vzorcev, v katerih so prisotna specif. protitelesa
Entero IgG+, IgM+, IgA+	0
Entero IgG+, IgM+, IgA-	1
Entero IgG+, IgM-, IgA+	16
Entero IgG+, IgM-, IgA-	37
Entero IgG-, IgM+, IgA+	0
Entero IgG-, IgM+, IgA-	1
Entero IgG-, IgM-, IgA+	10

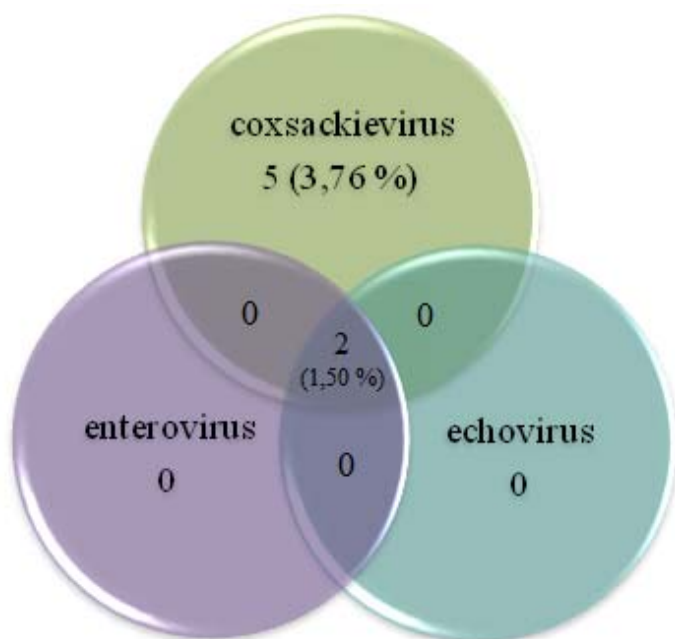
Preglednica 16 prikazuje število vzorcev, v katerih so prisotna specifična protitelesa razredov IgG, IgM in IgA, kot smo jih določili z metodo Serion elisa classic enterovirus. Podobno kot z drugima dvema testoma ELISA smo tudi v tem primeru največkrat dokazali le specifična protitelesa IgG. Takšnih vzorcev je 37. V enem vzorcu so bila hkrati prisotna specifična protitelesa IgG in IgM. V 16 vzorcih smo dokazali specifična protitelesa IgG in IgA. V nobenem vzorcu nismo ugotovili hkratne prisotnosti specifičnih protiteles IgM in IgA. V enem vzorcu so bila prisotna samo specifična protitelesa IgM, v 10 vzorcih pa so bila prisotna samo specifična protitelesa IgA.

#### 4.2 PRISOTNOST SPECIFIČNIH RAZREDOV PROTITELES GLEDE NA VRSTO VIRUSA



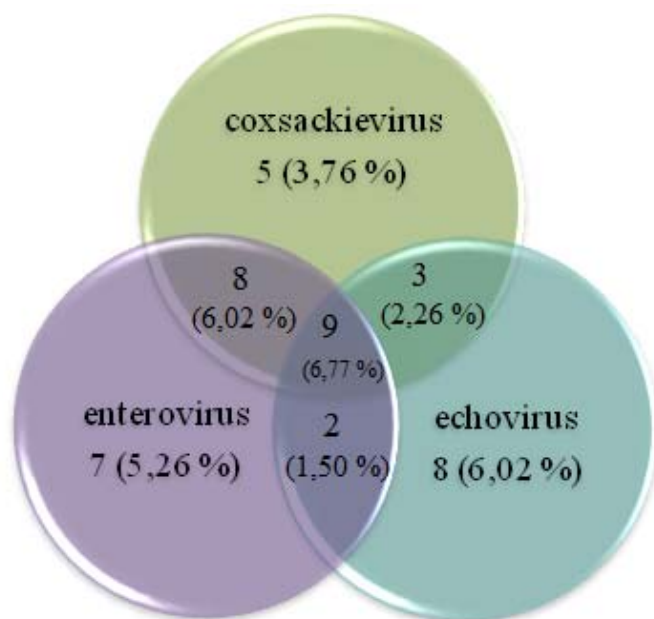
**Slika 3:** Grafični prikaz števila in deleža vzorcev seruma, v katerih so prisotna specifična protitelesa IgG, določena z vsakim od treh uporabljenih testov ELISA (coxsackievirus, echovirus, enterovirus)

V 32 (24,06 %) vzorcih smo dokazali specifična protitelesa IgG z vsem tremi uporabljenimi testi ELISA, v 3 (2,26 %) vzorcih smo dokazali protitelesa IgG s testoma ELISA coxsackievirus in echovirus, v 5 (3,76 %) vzorcih s testoma ELISA coxsackievirus in enterovirus, v 3 (2,26 %) vzorcih s testoma ELISA echovirus in enterovirus. V enem (0,75 %) vzorcu smo dokazali prisotnost specifičnih protiteles IgG samo s testom ELISA coxsackievirus, v 2 (1,50 %) vzorcih specifična protitelesa IgG s testom ELISA echovirus in v 14 (10,53 %) vzorcih s testom ELISA enterovirus.



**Slika 4:** Grafični prikaz števila in deleža vzorcev seruma, v katerih so prisotna specifična protitelesa IgM, določena z vsakim od treh uporabljenih testov ELISA (coxsackievirus, echovirus, enterovirus)

V samo 2 (1,50 %) vzorcih smo ugotovili specifična protitelesa IgM z vsemi tremi uporabljenimi testi ELISA in v 5 (3,76 %) vzorcih specifična protitelesa IgM s testom ELISA coxsackievirus. V ostalih vzorcih specifičnih protiteles IgM nismo zaznali.



**Slika 5:** Grafični prikaz števila in deleža vzorcev seruma, v katerih so prisotna specifična protitelesa IgA, določena z vsakim od treh uporabljenih testov ELISA (coxsackievirus, echovirus, enterovirus)

V 9 (6,77 %) vzorcih smo ugotovili specifična protitelesa IgA z vsemi tremi uporabljenimi testi ELISA, v 3 (2,26 %) vzorcih smo zaznali specifična protitelesa IgA s testoma ELISA coxsackievirus in echovirus, v 8 (6,02 %) vzorcih s testoma ELISA coxsackievirus in enterovirus. V 2 (1,50 %) vzorcih smo ugotovili specifična protitelesa IgA s testoma ELISA echovirus in enterovirus. V 5 (3,76 %) vzorcih smo ugotovili specifična protitelesa IgA le s testom ELISA coxsackievirus, v 8 (6,02 %) vzorcih pa specifična protitelesa IgA s testom ELISA echovirus in v 7 (5,26 %) vzorcih specifična protitelesa s testom ELISA enterovirus.

### 4.3 TIP OKUŽBE (AKUTNA, PRETEKLA)

**Preglednica 17:** Razdelitev pacientov glede na opredelitev faze okužbe v akutno, preteklo in v stanje brez prisotnosti specifičnih protiteles

	<b>RVK</b>	<b>ELISA</b>
<b>število pacientov z verjetno akutno okužbo</b>	64 (56,64 %)	41 (36,28 %)
<b>število pacientov z verjetno preteklo okužbo</b>		31 (27,43 %)
<b>število pacientov brez specifičnih protiteles</b>	49 (43,36 %)	41 (36,28 %)

Glede na rezultate metode ELISA, ki so prikazani v preglednici 12, smo paciente razdelili glede na akutni in pretekli tip okužbe oziroma na paciente brez specifičnih protiteles. RVK metoda za ločitev med akutno in preteklo okužbo ni primerna, saj ne moremo z gotovostjo trditi za kakšno okužbo gre, kajti s to metodo ne moremo ločiti posameznih razredov protiteles. Za zanesljivo interpretacijo pri RVK metodi je potreben parni serum, ki je odvzet v razmiku 5-7 dni. Štirikratni porast titra protiteles parnega seruma je znak za akutno okužbo, visoki titri protiteles v obeh vzorcih pa nakazujejo na nedavno ali kronično infekcijo. Zato je za natančnejšo določitev, ali gre za akutno ali preteklo okužbo, potrebna analiza z bolj natančnimi metodami, kot je npr. metoda ELISA, na podlagi katere smo ločili paciente z akutno in paciente z nedavno okužbo. Iz preglednice 17 lahko razberemo, da je bilo število pacientov z akutno okužbo 41 (36,28 %), število pacientov s preteklo okužbo 31 (27,43 %) in število pacientov brez specifičnih protiteles 41 (36,28 %). Iz rezultatov testiranja z metodo RVK pa lahko ločimo le paciente z okužbo od tistih brez okužbe. Pri 64 (56,64 %) pacientih smo potrdili prisotnost okužbe, pri 49 (43,36 %) pa nismo našli specifičnih protiteles.

**Preglednica 18:** Razdelitev pacientov z akutno okužbo glede na spol pri testiranju z metodo ELISA

število žensk z akutno okužbo pri testiranju z metodo ELISA	število moških z akutno okužbo pri testiranju z metodo ELISA
23 (56,1 %)	18 (43,9 %)

Paciente z akutno okužbo smo razdelili tudi glede na spol. Ugotovili smo, da je število žensk z akutno okužbo 23 (56,1 %), število moških pa 18 (43,9 %).

#### 4.4 PRIMERJAVA PARNIH SERUMOV

**Preglednica 19:** Primerjava parnih serumov testiranih z metodo RVK in ELISA

Pacient	Vzorec št.	1. testiranje pacienta		Vzorec št.	2. testiranje pacienta	
		RVK	ELISA		RVK	ELISA
1	7	1:20	pretekla okužba	8	1:40	pretekla okužba
2	11	1:80	akutna okužba	12	1:40	akutna okužba
3	14	1:40	pretekla okužba	15	neg. rezultat (AK)	pretekla okužba
4	17	1:160	akutna okužba	18	1:160	pretekla okužba
5	19	1:80	akutna okužba	20	1:40	akutna okužba
6	21	1:160	neg. rezultat	22	neg. rezultat	pretekla okužba
7	25	neg. rezultat	pretekla okužba	26	1:20	pretekla okužba
8	31	1:20	neg. rezultat	32	1:20	neg. rezultat
9	36	neg. rezultat	pretekla okužba	37	neg. rezultat	akutna okužba
10	44	1:160	pretekla okužba	45	1:160	pretekla okužba
11	47	1:20	neg. rezultat	48	1:20	neg. rezultat
12	52	neg. rezultat	neg. rezultat	53	neg. rezultat	neg. rezultat
13	60	neg. rezultat	akutna okužba	61	1:40	neg. rezultat
14	65	neg. rezultat	neg. rezultat	66	neg. rezultat	neg. rezultat
15	67	1:80	akutna okužba	68	1:80	akutna okužba
16	70	1:20	neg. rezultat	71	neg. rezultat	pretekla okužba
17	77	neg. rezultat	neg. rezultat	78	1:20	neg. rezultat
18	89	neg. rezultat	neg. rezultat	90	neg. rezultat	neg. rezultat
19	114	neg. rezultat	neg. rezultat	115	1:20	neg. rezultat
20	117	1:20	akutna okužba	118	1:40	akutna okužba

Izmed 133 vzorcev je bilo 20 takšnih, ki so pripadali istemu bolniku, in smo jih zato opredelili kot parne serume. Iz preglednice 19 vidimo, da pri pacientih št. 1, 3, 7 in 10, glede na testiranje z metodo ELISA, lahko na podlagi obeh testiranj trdimo, da gre za preteklo okužbo. Pri pacientih št. 2, 5, 15 in 20 pa obe testiranji kažeta na akutno okužbo.

Pri pacientu št. 4 drugo testiranje nakazuje, da je akutna faza že mimo in gre za preteklo okužbo. Pri pacientu št. 6 smo pri prvem testiranju z metodo RVK dokazali visok titer protiteles, medtem ko pri testiranju z metodo ELISA nismo dokazali prisotnosti protiteles. Tudi drugo testiranje z metodo RVK ni potrdilo prisotnosti protiteles, z metodo ELISA pa smo ugotovili le specifična protitelesa IgG, kar kaže na preteklo okužbo. Pri pacientih št. 8 in 11 smo pri obeh testiranjih z metodo RVK ugotovili nizek titer protiteles, medtem ko z metodo ELISA pri obeh testiranjih nismo zaznali prisotnosti specifičnih protiteles. Pri pacientu št. 9 so rezultati pri RVK v prvem in drugem testiranju negativni, medtem ko smo z metodo ELISA pri prvem testiranju ugotovili preteklo okužbo, pri drugem testiranju pa akutno okužbo. Pri pacientih št. 12, 14 in 18 v nobenem vzorcu nismo ugotovili prisotnosti protiteles. Pri pacientu št. 13 pri prvem testiranju z metodo RVK nismo ugotovili prisotnosti specifičnih protiteles, pri drugem testiranju pa smo ugotovili pozitiven rezultat s titrom 1:40. Pri istem bolniku je testiranje prvega vzorca z metodo ELISA kazalo na akutno okužbo, v drugem testiranju pa specifičnih protiteles ni bilo več zaznani. Pri pacientu št. 16 je prvo testiranje z metodo RVK pokazalo pozitiven rezultat v zelo nizkem titru, pri testiranju drugega vzorca z isto metodo pa specifičnih protiteles nismo mogli več ugotoviti. Medtem ko smo z metodo ELISA pri prvem testiranju ugotovili negativen rezultat, pa pri drugem testiranju rezultat kaže na preteklo okužbo. Pri pacientih št. 17 in 19 je pri prvem testiranju rezultat negativen, pri drugem testiranju pa dobimo nizke titre pri testiranju z metodo RVK, z metodo ELISA pa ponovno negativen rezultat.

#### 4.5 POGOSTOST OKUŽBE S COXSACKIEVIRUSI

Glede na to, s katerim od uporabljenih testov metode ELISA smo ugotovili najvišjo vrednost protiteles IgG, smo poskušali sklepati na domnevnega povzročitelja okužbe. Ugotovili smo, da bi lahko bili verjetni povzročitelji enterovirusi v 29 primerih, echovirusi v 29 primerih in coxackivirusi v 24 primerih.

**Preglednica 20:** Razdelitev vzorcev seruma glede na domnevnega povzročitelja okužbe pri testiranju z metodo ELISA

Št. vzorcev z najvišjim titrom protiteles proti coxsackievirusom	Št. vzorcev z najvišjim titrom protiteles proti echovirusom	Št. vzorcev z najvišjim titrom protiteles proti enterovirusom
24	29	29



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Miokarditis je pomemben in pogosto neprepoznan vzrok razširjene kardiomiopatije (Schultz in sod., 2009). Definiran je kot vnetje srčne mišice, do katerega pride zaradi miokardne infiltracije imunokompetentnih celic, ki so posledica srčne poškodbe nastale zaradi različnih vzrokov (Kühl in sod., 2009). Etiološki dejavniki pri kliničnem miokarditisu so pogosto neidentificirani. Najpogostejši virusni povzročitelji miokarditisa pa naj bi bili enterovirusi, ki lahko povzročijo pri bolnikih klinično zelo resna stanja, vključno z nenadno srčno smrtjo.

Cilj diplomske naloge je bil primerjati rezultate rutinskega testiranja serumov bolnikov s sumom na miokarditis z metodo RVK in z metodo ELISA na protitelesa proti enterovirusom ter ugotoviti, katera metoda je bolj optimalna za potrjevanje okužbe z enterovirusi pri ljudeh s sumom na miokarditis. Zanimalo nas je tudi v kakšnem odstotku so povzročitelji virusnega miokarditisa enterovirusi in ali je metoda ELISA primernejša za diagnostične namene, kot je metoda RVK. Predvidevali smo, da bomo z metodo ELISA dokazali več okužb z enterovirusi kot pa z metodo RVK. Pričakovali smo tudi, da bodo rezultati testiranja z metodo ELISA potrdili rezultate metode RVK.

Raziskavo smo izvedli na arhivskih serumih bolnikov, ki so v letu 2009 prispeli v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Ljubljana na redno diagnostiko za virusne okužbe miokarda. Pri redni diagnostiki so bili vzorci testirani z metodo RVK. Vzorci smo v okviru diplomske naloge ponovno testirali z metodo ELISA.

Da bi potrdili naše domneve smo izvedli raziskavo, v katero smo vključili 133 vzorcev serumov, od tega je bilo 20 serumov parnih, torej je bilo v analizo vključenih 113 pacientov. Vključili smo paciente, ki so bili starejši od 10 let in mlajši od 65 let, mediana starosti pacientov je znašala 39 let. Število moških vključenih v raziskavo je bilo 64, število žensk vključenih v raziskavo pa 49. 16 parnih serumov je pripadalo moškim, 4 parni serumi pa ženskam.

## 5.1 RAZLAGA REZULTATOV

Od 133 serumov testiranih z metodo RVK je bilo 73 takšnih, v katerih so bila prisotna protitelesa proti coxsackievirusom in echovirusom. Pri testiranju z metodo ELISA pa smo prisotnost protiteles proti različnim tipom eneterovirusov dokazali v 84 vzorcih. To potrjuje našo domnevo, da bi z metodo ELISA lahko dokazali več okužb kot z metodo RVK, saj je občutljivost metode ELISA višja kot pri metodi RVK. Pričakovali smo tudi, da bomo z metodo ELISA potrdili rezultate testiranja z metodo RVK.

Glede na rezultate smo ugotovili tudi kakšno je ujemanje rezultatov med metodama. Ugotovili smo, da je ujemanje med metodama 67,67 %, torej odstotek neujemanja znaša 32,33 %, kar ocenjujemo za razmeroma visoko neujemanje. 17 od 133 vzorcev je takšnih, pri katerih smo specifična protitelesa dokazali samo z metodo RVK, ne pa tudi z metodo ELISA. Interpretacija takega rezultata je težavna. Pri podrobnejšem pregledu rezultatov smo ugotovili, da sta med 17 vzorci samo 2 vzorca, ki imata po metodi RVK opredeljen titer specifičnih protiteles 1:160, kar predstavlja najvišjo določeno vrednost pri tej metodi. Oba vzorca sta z metodo ELISA imela vsaj pri enem od testiranj z metodo ELISA opredeljen mejni rezultat v sivi coni, ki smo ga v okviru te naloge dogovorno interpretirali kot negativnega. Vzrok za ugotovljeno razliko je lahko v okužbi s posebnim serotipom enterovirusa, ki morda ne reagira dobro z antigeni, ki so uporabljeni v testih ELISA. V vseh treh testih ELISA so uporabljeni samo 4 različni antigeni, kar je manj, kot je uporabljenih pri metodi RVK. Druga možnost za neskladen rezultat je v morebitni laboratorijski napaki pri izvedbi testa ELISA ali RVK, ki je ne moremo v popolnosti izključiti. Testa RVK namreč ni mogoče z zanesljivostjo ponoviti, saj se po navodilih proizvajalca izvaja le iz predhodno nezamrznjenega, svežega serumskega vzorca. V ostalih 15 vzorcih je bil določen najvišji titer 1:40, kar je samo ena razredčina nad mejno in se v laboratoriju pri klinični interpretaciji ne šteje kot klinično pomemben. Zelo verjetno ti vzorci predstavljajo dokaz rezidualnih protiteles po pretekli okužbi z enimi ali več enterovirusnimi serotipi.

26 je bilo pozitivnih z metodo ELISA, hkrati pa negativnih z metodo RVK. Vzorci, ki so pozitivni z metodo ELISA, negativni pa z metodo RVK verjetno potrjujejo našo domnevo, da bomo z metodo ELISA dokazali več okužb kot pa z metodo RVK.

Ugotovili smo tudi, da se pri pozitivnih vzorcih največkrat pojavijo samo protitelesa IgG, torej ne moremo natančno določiti, za kakšen stadij okužbe gre. Iz priloge A pa je razvidno tudi, da v primeru prisotnosti protiteles proti enemu od testiranih virusov, v vzorcu skoraj vedno dokažemo tudi protitelesa proti drugim testiranim virusom.

Rezultate smo razčlenili tudi glede na tip okužbe, ali gre za akutno ali preteklo okužbo. Razdelitev smo naredili na podlagi rezultatov metode ELISA. ELISA je visoko specifična in občutljiva metoda, s katero lahko poleg protiteles IgG, dokaj hitro in zanesljivo določimo tudi protitelesa IgM in IgA, ki so kazalci akutne okužbe (Avšič Županc, 2007). Za določitev akutne ali pretekle okužbe metoda RVK ni primerna. Zaradi pomanjkanja diferenciacije razredov protiteles z metodo RVK, je nujno potrebno testiranje parnega seruma, ki je odvzet v razmiku 5-7 dni, da lahko govorimo za kakšno okužbo gre (Virion/Serion, 2009a). Štirikratni porast titra protiteles parnega seruma je znak za akutno okužbo, visoki titri v dveh parnih vzorcih pa nakazujejo na nedavno ali kronično okužbo (Virion/Serion, 2009a). Z metodo RVK ne moremo natančno določiti ali gre za akutno ali preteklo okužbo, zato je potrebna analiza z bolj natančnimi metodami, s testi za dokazovanje specifičnih protiteles IgG, IgM in IgA (Virion/Serion, 2009a). V tabeli 17 so na podlagi rezultatov testa ELISA okužbe razdeljene na akutne in pretekle. 36,28 % okužb je akutnih, 27,43 % pa je preteklih. Akutne okužbe pa smo naprej razdelili še glede na spol. Iz podatkov v literaturi je znano, da je več kot dve tretjini okužb prisotnih pri moških. Delež moških vključenih v raziskavo je bil sicer res večji od deleža žensk vključenih v raziskavo, vendar pa je iz tabele 18 razvidno, da je delež akutnih okužb višji pri ženskah, in sicer je 56,1 % akutnih okužb prisotnih pri ženskah, 43,9 % akutnih okužb pa pri moških.

Izmed 133 serumskih vzorcev bolnikov je bilo 20 takšnih, ki so pripadali istemu bolniku in smo jih opredelili kot parne serume. Rezultati so prikazani v preglednici 19. Na težave pri interpretaciji smo naleteli pri interpretaciji rezultatov vzorcev pacienta 6, 9, 13 in 16. Pri pacientu 6 smo pri prvem testiranju z metodo RVK dokazali zelo visok titer protiteles (1:160), medtem ko smo pri drugem testiranju z metodo RVK dokazali negativen rezultat. Prav tako so pri istem pacientu rezultati testiranja z metodo ELISA nenavadni, saj pri prvem testiranju z metodo ELISA ne dokažemo prisotnosti protiteles, rezultati drugega testiranja pa nakazujejo na preteklo okužbo. Podobne ugotovitve smo zaznali pri pacientu

16, le da v tem primeru pri prvem testiranju z metodo RVK dokažemo nizek titer (1:20). Pri pacientu 9 z metodo RVK nismo zaznali specifičnih protiteles, medtem ko prvo testiranje z metodo ELISA nakazuje na preteklo okužbo, drugo testiranje pa na akutno okužbo. Nenavadni pa so tudi rezultati pacienta 13, saj pri prvem testiranju z metodo RVK ne dokažemo specifičnih protiteles, testiranje z metodo ELISA pa nakazuje na akutno okužbo, medtem ko pri drugem testiranju z metodo RVK dokažemo titer protiteles 1:40, z metodo ELISA pa ne dokažemo prisotnosti protiteles. Za pojasnitev interpretacijsko neskladnih rezultatov parnih serumov bi morali pridobiti še več podatkov, ki pa nam v okviru diplomskega dela niso bili na voljo. Za pravilno interpretacijo statusa okužbe bi potrebovali natančen čas odvzema vzorcev, da bi lahko določili časovni interval med odvzemoma parnih vzorcev. Za nekaj vzorcev, za katere smo uspeli pridobiti podatke, smo ugotovili, da niso bili odvzeti v priporočenem obdobju enega do dveh tednov po prvem odvzemu, ampak v obdobju več mesecev. Menimo, da je za natančno evaluacijo uporabnosti metode ELISA za diagnostiko enterovirusnih okužb potrebno novo zbiranje vzorcev v sodelovanju s kliničnimi zdravniki, kjer bi imeli na voljo podatke o odvzemu vzorca, podatke o začetku bolezni in kliničnem stanju bolnika.

Iz podatkov v znanstveni literaturi smo predvidevali, da bi v izbrani skupini lahko največkrat dokazali okužbo s coxsackievirusi. Študija Coltarta in sodelavcev (1984) je pokazala, da so pri eni tretjini pacientov z akutnim miokarditisom in akutnim perikarditisom prisotni dokazi, ki nakazujejo na nedavno okužbo s coxsackie B virusi. Vendar pa je ta številka verjetno podcenjena, saj so bili nekateri pacienti sprejeti na zdravljenje veliko pozneje, ko je nastopila začetna okužba, ki je lahko potekala tudi asimptomatsko (Coltart in sod., 1984). Od okužbe pa do časa, ko so se pojavile patološke spremembe na srcu, je lahko virusno-specifičen odziv IgM že padel in ga ni bilo več moč zaznati (Coltart in sod., 1984). Ne smemo pa zanemariti, da so za akutni miokarditis in perikarditis odgovorni še nekateri drugi enterovirusi in ostali dejavniki.

Tudi naša raziskava je pokazala, da so v tretjini primerov virusnega miokarditisa verjetni povzročitelji eden ali več različnih tipov enterovirusov. Sklepanje na povzročitelja iz najvišje dosežene vrednosti protiteles proti določenemu virusu ima številne pomanjkljivosti in pasti. V uporabljane teste Serion elisa classic za določanje protiteles IgG/IgM/IgA proti coxsackievirusom, echovirusom in enterovirusom namreč niso vključeni

vsi tipi omenjenih virusov. Vsi omenjeni testi po zagotovilih proizvajalca omogočajo zaradi velike navzkrižne reaktivosti dokazovanje okužb s širokim spektrom enterovirusov in ne le proti tistim, ki so navedeni v imenu testa. To so potrdili tudi naši rezultati, saj ima večina bolnikov protitelesa dokazana z vsemi tremi testi ELISA. Kljub temu pa obstajajo pacienti, kjer je bila okužba potrjena le z enim ali dvema uporabljenima testoma, zato menimo, da je za zanesljivo dokazovanje okužb miokarda potrebna uporaba vseh treh testov in predvsem nadaljnja natančna evaluacija testov predvsem pri pacientih s parnimi vzorci in dobro opredeljena klinična slika. V prid uporabi metode ELISA gre tudi dejstvo, da je metoda ELISA bolj ponovljiva in lažja za avtomatizacijo od metode RVK, omogoča pa tudi opredelitev stadija okužbe zaradi možnosti dokazovanja različnih razredov protiteles.

Natančno opredelitev povzročitelja virusnega miokarditisa bi lahko izvedli tudi z uporabo ene od neposrednih metod npr. reakcije PCR, s katero bi pomnožili del genoma enterovirusov. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja pomnoženega genomskega predela bi lahko natančno in zanesljivo opredelili tip enterovirusa. Pri neposredni diagnostiki pa je največja ovira v tem, da pacienti pridejo do sekundarne zdravstvene ustanove razmeroma pozno in se o virusni diagnostiki zdravniki odločajo takrat, ko je brez uporabe invazivnih metod, kot je npr. biopsija miokarda, neporedno dokazovanje virusnih nukleinskih kislin že oteženo.

## 5.2 SKLEPI

- Med 133 izbranimi vzorci pacientov s sumom na virusni miokarditis smo protitelesa proti enterovirusom dokazali z metodo RVK v 54,9 % in z metodo ELISA v 61,2 % pregledanih vzorcev.
- Prisotnost protiteles smo ugotovili z obema metodama v 56 vzorcih in odsotnost protiteles pri 34 vzorcih. Skupno ujemanje interpretacij testiranja z obema metodama je 61,15 %.
- Ugotovili smo, da se rezultati testiranja z metodama RVK in ELISA medsebojno ne ujemajo pri 43 oziroma 32,3 % vzorcev. Pri 26 vzorcih smo protitelesa dokazali le z metodo ELISA in pri 17 vzorcih le z metodo RVK.

- V serumskih vzorcih smo pri testiranju z metodo ELISA najpogosteje dokazali samo protitelesa razreda IgG.
- Prisotnost protiteles razreda IgG smo v večini primerov dokazali z vsemi tremi uporabljenimi testi ELISA (enterovirus, coxackievirus, echovirus), kar kaže na navzkrižno reaktivnost ali pa na prekuženost z več tipi enterovirusov.
- Za zanesljivo določitev stadija okužbe bi bil pri vseh pacientih zaželen parni serum odvzet v razmaku 7-14 dni.
- Glede na rezultate naloge menimo, da je metoda ELISA primernejša za dokazovanje okužb z enterovirusi pri bolnikih s sumom na miokarditis od metode RVK.

## 6 POVZETEK

Enterovirusi so med najpogostejšimi patogenimi človeka. Večinoma okužbe potekajo asimptomatsko, vendar pa lahko povzročajo pri bolnikih zelo resna klinična stanja. Enterovirusi so zelo verjetno najpogostejši povzročitelj miokarditisa, ki je lahko zelo resno klinično stanje in celo vodi do nenadne srčne smrti. Izmed le-teh naj bi bili najpogostejši povzročitelji echovirusi in coxsackievirusi. Predvsem naj bi se najpogosteje pojavljal serotip coxsackievirus B3. Diagnostika enterovirusnega miokarditisa pa je zaradi izredne genetske pestrosti le-teh zelo zahtevna. Za pravilno etiološko diagnozo miokarditisa trenutno ni na voljo optimalnih metod. Za diagnostiko so primerne predvsem serološke preiskave z metodama RVK in ELISA, diagnozo pa lahko potrdimo tudi z molekularno-biološkimi metodami, kot je npr. PCR in z osamitvijo virusa. Kadar obstaja sum na enterovirusni miokarditis se poslužujejo predvsem serološke preiskave z metodo RVK, s katero lahko dokazujemo protitelesa proti coxsackievirusom A9, B1-B6 in echovirusom, vendar pa ne moremo dokazovati posameznih razredov protiteles. Zato smo v diplomski nalogi želeli ugotoviti ali bi lahko testiranje na protitelesa proti enterovirusom pri bolnikih s sumom na enterovirusni miokarditis, ki se izvaja z metodo RVK, nadomestili s sodobnejšo metodo ELISA, ki nam omogoča tudi opredelitev stadija okužbe, zaradi možnosti dokazovanja različnih razredov protiteles, je bolj ponovljiva in lažja za avtomatizacijo. Raziskavo smo izvedli na arhivskih serumih bolnikov, ki so v letu 2009 prispeli v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Pri redni diagnostiki so bili vzorci testirani z metodo RVK. V sklopu diplomske naloge pa smo vzorce dodatno testirali z metodo ELISA. V raziskavo smo vključili 133 serumskih vzorcev bolnikov s sumom na miokarditis, od tega je bilo 20 vzorcev, ki so bili parni serumi. V raziskavi smo dokazali več okužb z metodo ELISA kot pa z metodo RVK. Z metodo RVK je bilo 73 (54,89 %) od 133 testiranih serumov pozitivnih na protitelesa, z metodo ELISA pa smo protitelesa dokazali v 84 (61,15 %) vzorcih. Ugotovili smo, da ujemanje med metodama znaša zgolj 67,67 %, torej je neujemanje 32,33 %, kar ocenjujemo za razmeroma visoko neujemanje. Rezultati govorijo v prid metode ELISA, kar potrjuje tudi našo domnevo, da bi zaradi večje občutljivosti metode ELISA z le-to dokazali več okužb kot pa z metodo RVK. Ugotovili smo tudi, da se pri pozitivnih vzorcih testiranih z metodo ELISA največkrat

pojavijo samo protitelesa IgG, torej ne vemo natančno za kakšen stadij okužbe gre. Znano je, da naj bi bili enterovirusi v tretjini primerov najverjetnejši povzročitelji virusnega miokarditisa. Tudi z našo raziskavo smo pokazali, da so v tretjini primerov virusnega miokarditisa povzročitelji eden ali več različnih tipov enterovirusov. Zanimalo nas je tudi ali bomo v preiskovani skupini bolnikov največkrat dokazali okužbo s coxsackievirusi, saj so le-ti v znanstveni literaturi najpogosteje opisani kot povzročitelji virusnega miokarditisa. V naši raziskavi pa so v največ primerih, po naši definiciji, najverjetnejši povzročitelji okužbe echovirusi in enterovirusi, ki naj bi bili domnevni povzročitelji okužbe v 29 vzorcih, coxsackievirusi pa naj bi bili odgovorni za 24 okužb. Vendar pa ima sklepanje na povzročitelja iz najvišje dosežene vrednosti protiteles proti določenemu virusu številne pomanjkljivosti. V vse tri uporabljene teste Serion elisa classic niso vključeni vsi tipi coxsackievirusov, echovirusov in enterovirusov, prav tako je zaradi velike navzkrižne reaktivnosti možno dokazovanje okužb s širokim spektrom enterovirusov. Natančnejšo opredelitev domnevnega povzročitelja virusnega miokarditisa bi lahko izvedli z uporabo molekularno-biološke metode PCR. Na podlagi določitve nukleotidnega zaporedja pomnoženega genomskega dela bi lahko natančno in zelo zanesljivo opredelili tip enterovirusa.



## 7 VIRI

Avšič Županc T. 2007. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 119-127

Bendig J.W.A., Molyneaux P. 1996. Sensitivity and specificity of  $\mu$ -capture ELISA for detection of enterovirus IgM. *Journal of Virological Methods*, 59: 23-32

Bolte H.D. 1984. Introduction. V: *Viral heart disease*. Bolte H.D. (ed.). New York, Springer: 3-4

Cohen J.I. 2008. Enteroviruses and Reoviruses. V: *Harrison's principles of internal medicine*. 17<sup>th</sup> ed. Fauci A.S., Braunwald E., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L., Loscalzo J. (eds.). New York, The McGraw-Hill: 1208-1213

Coltart D.J., El-Hagrassy M.M.O., Banatvala J.E. 1984. Coxsackie B virus-specific IgM responses in patients with cardiac and other diseases. V: *Viral heart disease*. Bolte H.D. (ed.). New York, Springer: 89-94

Drinovec B. 2007. Poimenovanje in razvrstitev virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-20

ICTV. 2010. Enterovirus types. Picornaviridae study group. London, ICTV-International Committee on Taxonomy of Viruses: 5 str.

[http://www.picornastudygroup.com/types/enterovirus/ev\\_types.htm](http://www.picornastudygroup.com/types/enterovirus/ev_types.htm) (10. dec. 2010)

Kühl U., Schultheiss H.P. 2009. Viral myocarditis diagnosis, aetiology and management. *Drugs*, 69, 10: 1287-1302

Maier R., Krebs P., Ludwig B. 2004. Immunopathological basis of virus-induced myocarditis. *Clinical & Developmental Immunology*, 11, 1: 1-5

Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. 2002. Infekcijske bolezni. Ljubljana, Založba Tangram: 400-409

Muir P., Nicholson F., Illavia S.J., McNeil T.S., Ajetunmobi J.F., Dunn H., Starkey W.G., Reetoo K.N., Cary N.R.B, Parameshwar J., Banatvala J.E. 1996. Serological and molecular evidence of enterovirus infection in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Heart*, 76:243-249

Romero J.R. 2007. Enteroviruses and Parechoviruses. V: Manual of clinical microbiology. 9<sup>th</sup> ed. Vol. 2. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. (eds.). Washington, D.C., ASM press: 1392-1404

Samuelson A., Forsgren M., Johansson B., Wahren B., Sallberg M. 1994. Molecular basis for serological cross-reactivity between Enteroviruses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1, 3: 336-341

Schultz J.C., Hilliard A.A., Cooper L.T., Rihal C.S. 2009. Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo Clinic Proceedings*, 84, 11: 1001-1009

Spanakis N., Manolis E.N., Tsakris A., Tsiodras S., Panagiotopoulos T., Saroglou G., Legakis N.J. 2005. Coxsackievirus B3 sequences in the myocardium of fatal cases in a cluster of acute myocarditis in Greece. *Journal of Clinical Pathology*, 58: 357-360

Virion/Serion. 2009a. Complement Fixation Test (CFT). Version 9.09/01-1. Würzburg, Institut Virion\Serion GmbH: 16 str.

Virion/Serion. 2009b. SERION ELISA classic Coxsackievirus IgG/IgM/IgA. V 12.09/12-1. Würzburg, Institut Virion\Serion GmbH: 22 str.

Virion/Serion. 2005. SERION ELISA classic Echovirus IgG/IgM/IgA. V 09/2005. Würzburg, Institut Virion\Serion GmbH: 9 str.

Virion/Serion. 2004. SERION ELISA classic Enterovirus IgG/IgM/IgA. V 12/2004. Würzburg, Institut Virion\Serion GmbH: 9 str.

Witsø E., Palacios G., Cinek O., Stene L.C., Grinde B., Janowitz D., Lipkin W.I., Rønningen K.S. 2006. High prevalence of human enteroviruses A infections in natural circulation of human enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 11: 4095-4100

Xu F., Yan Q., Wang H., Niu J., Li L., Zhu F. He S., Zhang S., Weng Z., Cheng T., Cai Y., He D., Chen Y., Ge S., Yeo A.E.T., Zhang J., Ng M., Xia N. 2010. Performance of detecting IgM antibodies against Enterovirus 71 for early diagnosis. *PLoS ONE*, 5, 6: e11388, doi: 10.1371/journal.pone.0011388: 4 str.

## ZAHVALA

V prvi vrsti bi se rada zahvalila mojemu mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med., ki me je kljub prenatrpanemu urniku sprejel pod svoje mentorstvo, in mi s svojimi nasveti in odgovori na moja številna vprašanja pomagal pri nastajanju mojega diplomskega dela.

Hvala tudi Nataši Peternelj in Tanji Kozinc za pomoč pri izvedbi praktičnega dela naloge.

Zahvala gre tudi mojemu recenzentu doc. dr. Alojzu Ihanu, dr. med., za hiter pregled naloge.

Največja zahvala gre pa seveda moji družini, ki mi je vedno stala ob strani, me vzpodbujala na moji poti do uspeha, z mano delila smeh in solze in mi tudi omogočila študij v Ljubljani.

Hvala Sašu, sošolcu iz srednješolskih dni, za pomoč pri oblikovanju diplome. Hvala prijateljici Katji za pomoč pri oblikovanju angleškega izvlečka in prijateljici Nataši za lektoriranje naloge ter hvala vsem ostalim prijateljem in prijateljicam za vse vzpodbude in vse lepe trenutke v njihovi družbi.

*Prijatelj moj. Nikdar ne pričakuješ preveč od mene.*

*Vesel si, kadar uspem,*

*toda tudi neuspeh nič ne de.*

*Pomagaš mi, kolikor moreš – toda*

*najbolj pomembno je, da si ob meni.*

(Wendy Jean Smith)



Nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja posameznih vzorcev seruma z metodo RVK in z metodo ELISA.

114	24M	ro	ro	NEG	NEG	NEG	ro	NEG	NEG	NEG	174	NEG	34	NEG	16	NEG	323	NEG	43	NEG	16	NEG	322	NEG	24	NEG	324	NEG	
120	61Z	si	si	si	si	si	si	si	si	si	2133	POZ	35	NEG	366	POZ/NEG	1614	POZ	173	NEG	305	POZ	311	POZ	316	NEG	312	POZ	
121	34Z	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	1093	POZ	15	NEG	3667	POZ	649	NEG	69	NEG	154	NEG	1113	POZ	35	NEG	318	NEG	
122	22M	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	NEG(AK)	809	NEG	22	NEG	114	NEG	116	POZ	129	NEG	92	NEG	375	POZ/NEG	38	NEG	15	NEG
127	34Z	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	NEG(AK)	1131	POZ	34	NEG	369	POZ/NEG	494	NEG	168	NEG	652	POZ	324	POZ	113	NEG	416	POZ/NEG
128	22Z	ro	NEG	NEG	ro	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POZ	15	NEG	31	NEG	492	POZ/NEG	244	NEG	139	NEG	149	NEG	457	NEG	142	NEG	262	NEG
129	41Z	ro	NEG	NEG	ro	NEG	ro	NEG	NEG	POZ	84	NEG	19	NEG	357	POZ	38	NEG	37	NEG	471	POZ/NEG	357	NEG	163	NEG	397	POZ/NEG	
129	51Z	si	si	si	si	si	si	si	si	si	NEG	1468	POZ	31	NEG	316	POZ	1557	POZ	111	NEG	264	NEG	3187	POZ	16	NEG	71	NEG
127	41M	si	si	si	si	si	si	si	si	si	NEG	227	NEG	18	NEG	108	NEG	179	NEG	219	NEG	248	NEG	273	NEG	12	NEG	59	NEG
128	11M	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	POZ	1994	POZ	117	NEG	221	NEG	1052	POZ	134	POZ/NEG	253	NEG	1306-04	POZ	163	POZ/NEG	258	NEG
129	41Z	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	ro	POZ	88	POZ/NEG	317	NEG	246	NEG	407	NEG	8	NEG	307	POZ/NEG	402	NEG	17	NEG	2168	POZ
130	33M	ro	ro	ro	ro	NEG	ro	NEG	ro	ro	POZ	434	NEG	30	NEG	312	NEG	136	NEG	164	NEG	98	NEG	476	NEG	342	POZ/NEG	311	NEG
131	21Z	si	si	si	si	si	si	si	si	si	NEG	569	NEG	25	NEG	318	POZ	365	NEG	47	NEG	305	POZ	1306	POZ	111	NEG	1739	POZ
132	31Z	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	ak	NEG(AK)	372	POZ/NEG	***	POZ	3611	POZ	361	POZ/NEG	3631	POZ	278	NEG	384	POZ/NEG	***	POZ	31	POZ/NEG
133	53Z	ro	ro	ro	NEG	NEG	ro	NEG	ro	ro	POZ	362	NEG	33	NEG	326	POZ	178	NEG	139	NEG	151	POZ	64	NEG	15	NEG	1216	NEG