

PRIMERJAVA DVEH PRESEJALNIH METOD ZA ODKRIVANJE INFLUENCE A, INFLUNCE B IN RSV: ELISA IN MULTIPLEKS RT-PCR COMPARISON OF ELISA AND MULTIPLEX RT-PCR SCREENING ASSAYS FOR DETECTION OF INFLUENZA A, INFLUENZA B AND RSV

Katarina Prosenc¹, Antonija Kotnik¹, Vesna Šubelj¹, Maja Sočan¹

Prispelo: 3. 11. 2003 – Sprejeto: 25. 11. 2004

Izvorni znanstveni članek

UDK 616.9: 57.83

Izvleček

V zimskem času so akutne okužbe dihal vzrok izrazitega porasta obolevnosti in umrljivosti. Med pomembnejšimi povzročitelji so virusi influence in RSV. Zaradi neznačilne klinične slike je potrebno kroženje teh virusov potrditi z virološkimi metodami. Ker je osamitev virusov v celični kulturi zahtevna in dolgotrajna, skušamo prve podatke dobiti s hitrejšimi metodami. Kot presejalni metodi sta bili obravnavni encimsko-immunski test (ELISA) in multipleksna verižna reakcija s polimerazo z reverznim prepisom (RT-PCR). Slednja omogoča odkrivanje več antigenov hkrati. Prilagojena je bila tako, da sta reverzni prepis in pomnoževanje DNK potekala s pripravo ene reakcijske mešanice. Brise žrela in nosu so pri bolnikih s klinično sliko gripi podobne bolezni odvzeli zdravniki, ki sodelujejo v mreži za epidemiološko in virološko spremljanje gripe in zdravniki Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani. Obdelanih je bilo 605 vzorcev. Z ELISA je bil dokazan virus influence A v 2,5%, virus influence B v 6,3% in RSV v 2% vzorcev, z RT-PCR pa genom influence A v 3,6%, influence B v 18,6% in RSV v 3% vzorcev. Iz vzorcev, ki so bili pozitivni s katero koli od uporabljenih tehnik, je bilo namnoževanje virusov v celični kulturi za virus influence A uspešno iz 2 vzorcev, za virus influence B iz 33 in za RSV iz 5 vzorcev. Ugotovljeno je bilo, da je presejalna metoda RT-PCR bolj občutljiva kot ELISA in da poveča tudi delež uspešnih osamitev v celičnih kulturah, kar je izrednega pomena za tipizacijo in subtipizacijo virusov influence. Tehnika RT-PCR je bolj občutljiva od tehnike ELISA v vseh starostnih skupinah, razlika pa se v višjih starostnih skupinah povečuje v prid RT-PCR. Posebej je opazno povečanje možnosti odkrivanja virusov influence in RSV z RT-PCR v starostnih skupinah nad 5 let. Kljub večji zahtevnosti in višji ceni se je RT-PCR izkazal za primemnejšo presejalno metodo kot ELISA.

Ključne besede: influenza, RSV, hitri testi, ELISA, RT-PCR

Original scientific article

UDC 616.9: 57.83

Abstract

Acute respiratory tract infections (ARI) are the leading cause of increased morbidity and mortality in winter months. Because of nonspecific clinical symptoms of influenza, laboratory confirmation is essential for surveying influenza spread in the community. Rapid tests, such as enzyme linked immunoassay (ELISA) and multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), were introduced to replace the time-consuming isolation of influenza and RSV viruses. Multiplex RT-PCR allows for detection of three different antigens during a single test. The test was adapted to enable reverse transcription and DNA replication to be processed in the same reaction mix. Throat and nasal swabs were obtained from out-patients and in-patients with ARI. ELISA identified influenza A in 2.5%, influenza B in 6.3% and RSV in 2% of the 605 clinical samples tested. Detection rates achieved by RT-PCR were 3.6%, 18.6 % and 3%, respectively. For isolation in cell culture all ELISA and/or RT-PCR-positive samples were used.

¹ Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Center za nalezljive bolezni, Trubarjeva 2, 1000 Ljubljana
Kontaktni naslov: e-pošta: katarina.prosenc@ivz-rs.si

Influenza A virus was recovered from two, influenza B from 33 and RSV from five samples. RT-PCR was found to be a more sensitive test than ELISA. It improved the rate of virus isolation from RT-PCR-positive samples, which is of utmost importance for typification and sub-typification of influenza viruses. Higher sensitivity of RT-PCR was established in all age groups. RT-PCR yielded better detection results than ELISA, especially in the age group 5 years and over. Despite its higher cost and greater expertise required, RT-PCR offers a significant advantage over ELISA, and is superior to it in influenza screening and RSV detection.

Key words: influenza, RSV, rapid assays, ELISA, RT-PCR

Uvod

Gripa je akutna virusna okužba dihal, za katero v kratkem obdobju oboli precejšen del prebivalstva. V času epidemije običajno izrazito poraste obolevnost, umrljivost, poveča se število hospitalizacij. Ker je klinična slika gripe neznačilna, je potrebno kroženje virusa influence potrditi z virološkimi metodami, najbolje z osamitvijo virusa influence v celični kulturi. Izolacija je zahtevna metoda. Običajno traja več dni, da uspemo virus osamiti in še več, da ga tipiziramo. V času epidemije gripe je vzorcev zgomijih dihal veliko, običajno več, kot bi jih uspeli nanesti v celično kulturo. Smiselno je, da najprej z eno od hitrih metod potrdimo prisotnost virusa influence v kužnini in le pozitivne vzorce nanesimo na celično kulturo.

Za potrditev prisotnosti virusa influence v vzorcu (antigena ali genoma) obstaja več presejalnih mikrobioloških metod, kot so direktna imunofluorescenca (DIF), encimsko imunski test (ELISA) in verižna reakcija s polimerazo z reverznim prepisom (RT-PCR). Namen naše raziskave je bil primerjava tehnik RT-PCR in ELISA kot presejalnih metod za ugotavljanje prisotnosti virusov influence in RSV v brisih nosu in žrela. Tehnika DIF je sicer zelo hitra, vendar zelo odvisna od kakovosti vzorca in izurjenosti osebe, ki odčitava rezultate. Ocenjujejo, da je občutljivost te metode od 50% do 90% (1-3). Za metodo ELISA se je občutljivost v različnih raziskavah pokazala med 50% in 80%, za metodo RT-PCR pa 75% do 100% (1-4). V raziskavi nas je zanimalo tudi, kako presejalna metoda vpliva na delež osamitev v celični kulturi.

Materiali in metode

Brise žrela in nosu so odvzeli zdravniki, ki sodelujejo v mreži za epidemiološko in virološko spremljanje gripe in zdravniki Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani. Vzorce so odvzeli pri bolnikih s klinično sliko gripi podobne bolezni. Kužnine smo zbirali v obdobju, ko pričakujemo kroženje virusov influence; od 39. tedna leta 2001 do 19. tedna leta 2002. Ob odvzemu brisa so zdravniki izpolnili vprašalnik, ki je zajemal tudi starost bolnika.

Brisi so bili ob bolniku shranjeni v transportni medij EMEM (Eagle's minimum essential medium) in v 1 uri do 2 dneh poslani v naš laboratorij. V laboratoriju smo jih razdelili v tri dele. Iz prvega dela smo takoj ekstrahirali ribonukleinsko kislino (RNK), drugi del smo uporabili za test ELISA, tretji del smo obdelali z antibiotiki in ga shranili za nanos v celično kulturo.

S testom ELISA smo iskali vsak antigen posebej. Uporabili smo test, ki je dostopen na trgu (Virion-Serion, Nemčija) in delali po navodilih proizvajalca.

RNK smo ekstrahirali iz 200 µl vzorca z reagenti High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche diagnostic GmbH, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Končna prostomina RNK, raztopljene v vodi brez nukleaz, je bila 50 µl.

Začetni oligonukleotidi za detekcijo RNK virusov influence A in influence B zajemajo dobro ohranjene dele genoma, ki kodirajo nestrukturane beljakovine, za detekcijo virusa RSV pa prav tako dobro ohranjen del genoma, ki kodira fuzijski glikoprotein. Uporabljeni začetni oligonukleotidi, reakcijska mešanica ter temperaturni pogoji za reverzni prepis in PCR so bili prej opisani (5), vendar smo reakcijsko mešanico in temperaturne pogoje prilagodili tako, da je v eni reakciji brez prekinitve in odpiranja reakcijskih posodic potekel reverzni prepis RNK v DNK in nato pomnoževanje določenih specifičnih odsekov DNK. Uporabili smo reagente AccessQuick RT-PCR System (Promega, ZDA).

Pričakovani pridelki RT-PCR so bili veliki 190 baznih parov (bp) (influenca A), 239 bp (RSV) in 249 bp (influenca B). Z etidijevim bromidom obarvane pridelke RT-PCR smo analizirali z elektroforezo v 2% agaroznem gelu in uporabo UV transiluminatorja. Vzorce smo v reakciji RT-PCR označili z dioksigeninom-11-dUTP. Tako smo lahko pozitivne potrdili še s hibridizacijo z notranjimi biotininiranimi sondami za posamezne antigene (5). Uporabili smo reagente PCR ELISA DIG Detection (Roche diagnostic GmbH, Nemčija).

Za preprečevanje navzkrižne kontaminacije so postopki ekstrakcije RNK, priprave reakcijske mešanice za RT-PCR in delo s pridelki RT-PCR potekali v ločenih prostorih. V vsakem prostoru smo uporabljali poseben komplet pipet in pipetne nastavke s filtri. Pri vseh postopkih smo uporabljali zaščitne rokavice za enkratno uporabo ter v vsakem

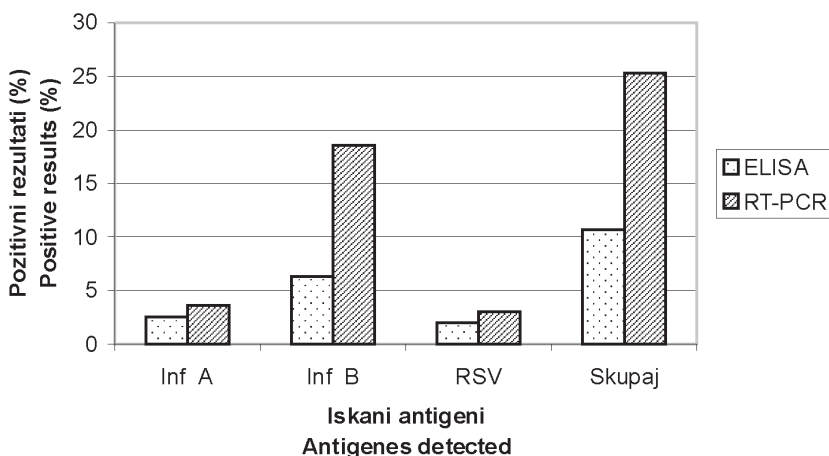
prostoru drugo zaščitno obleko. Delovne površine, stojala, centrifuge in pipete smo pred in po uporabi razkužili z ustreznimi sredstvi. Vse reakcije smo nadzorovali z uporabo pozitivnih in negativnih kontrol.

Vse vzorce, ki so dali pozitiven rezultat s testom ELISA ali s testom RT-PCR, smo nanegli v stalno kulturo celic pasjih ledvic MDCK (Madin-Darby canine kidney), ki je priporočena kultura za namnoževanje virusov influence (1) oziroma v stalno kulturo humanih epitelijskih celic žrela Hep2, ki je priporočena kultura za namnoževanje RSV (6).

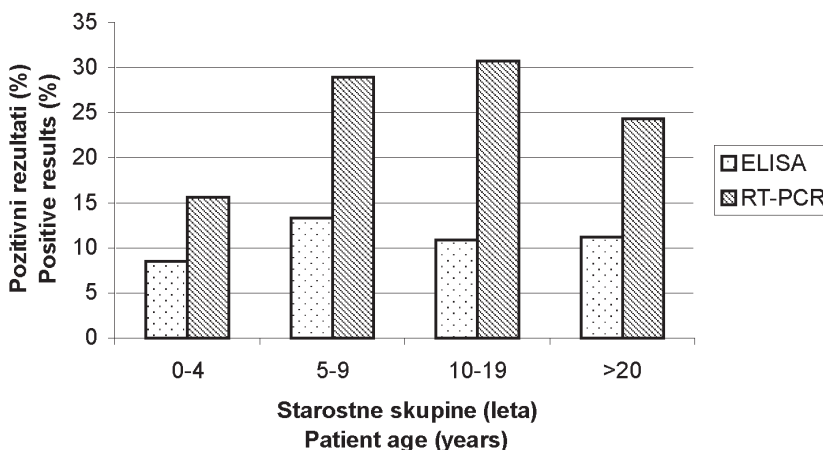
Rezultati

V obdobju od 39. tedna leta 2001 do 19. tedna leta 2002 smo zbrali 605 vzorcev bolnikov, ki so oboleli za

gripi podobno boleznijo (365 brisov žrela in 240 brisov nosa). 23,8% bolnikov je bilo starih med 0 in 4 leta, 13,9% med 5 in 9 let, 33,9% med 10 in 20 let, 28,4% pa je bilo starejših od 20 let. Z metodo ELISA smo dokazali virus influence A v 15 vzorcih (2,5 %), virus influence B v 38 vzorcih (6,3%) in RSV v 12 vzorcih (2%). Z metodo RT-PCR smo odkrili genom influence A v 22 vzorcih (3,6%), influence B v 113 vzorcih (18,6%) in RSV v 18 vzorcih (3%) (Slika 1). Dokazovanje virusov z različnimi metodami smo primerjali še po starostnih skupinah (Slika 2). Iz vzorcev, ki so se izkazali pozitivni s katero koli izmed uporabljenih tehnik, smo v celični kulturi uspeli namnožiti virus influence A iz 2 vzorcev, virus influence B iz 33 vzorcev in RSV iz 5 vzorcev.



Slika 1. Deleži antigenov influence A, influence B in RSV, ki smo jih dokazali z različnimi metodama
 Figure 1. Percentage of the Influenza A, Influenza B and RSV antigens detected with different methods

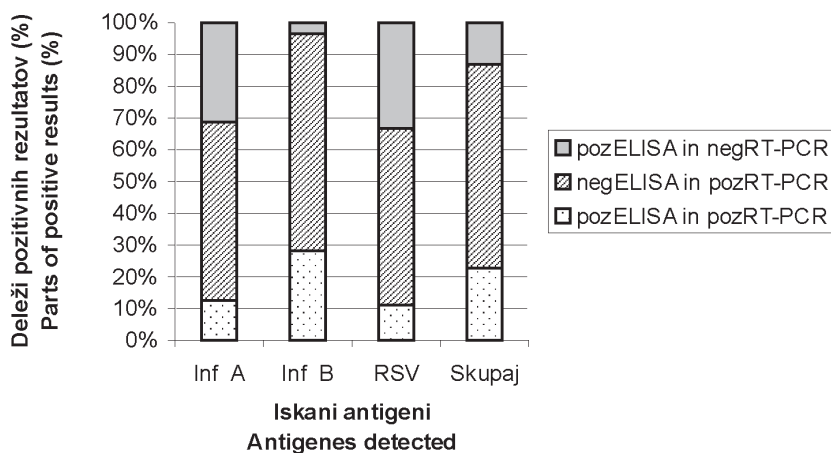


Slika 2. Deleži z različnimi metodami dokazanih virusnih antigenov po starostnih skupinah
 Figure 2. Percentage of viral antigens detected with different methods in four age groups

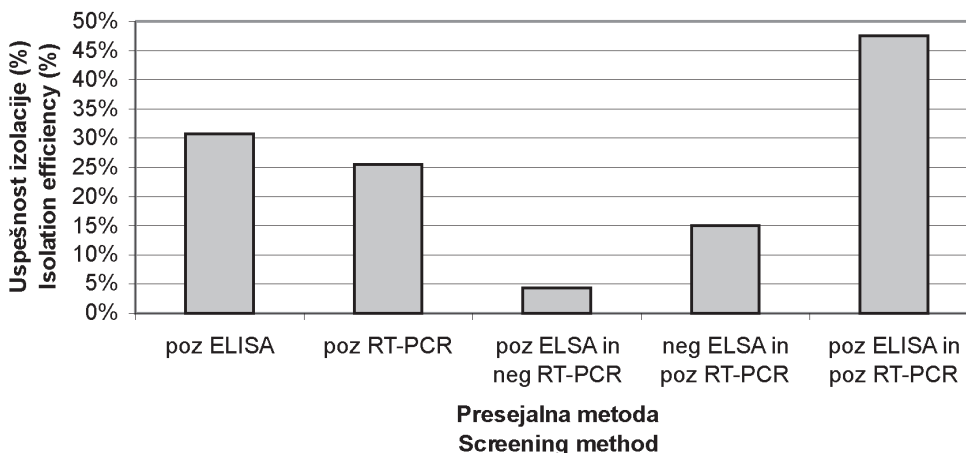
Razprava

Da bi zagotovili čim bolj občutljivo presejanje vzorcev za ugotavljanje prisotnosti treh virusov, ki igrajo pomembno vlogo kot povzročitelji akutnih dihalnih okužb in gripi podobnih bolezni v sezoni gripe, smo preizkusili dve metodi. Za odkrivanje virusov influence A, influence B in RSV smo uporabili metodi ELISA in RT-PCR. Vseh pozitivnih vzorcev glede na vse tri viruse in ne glede na uporabljeno metodo je bilo 176. Z obema metodama vzporedno smo iskane antigene odkrili v 40 (22,7%) vseh pozitivnih vzorcev, v dodatnih 113 (64,2%) smo jih odkrili le z metodo RT-PCR in ne z metodo ELISA, v 23 (13,1%) pa le z metodo ELISA in ne z metodo RT-PCR (Slika 3).

Ne glede na presejalno metodo, ki je dala pozitiven rezultat, smo vse pozitivne vzorce nanesti v ustrezne celične kulture. Iz vzorcev pozitivnih z metodo ELISA je bila izolacija virusov uspešna v 30,7% (20 od 65), iz vzorcev pozitivnih z metodo RT-PCR pa v 25,5% (39 od 153) (Slika 4). Nižji odstotek izolacije iz vzorcev pozitivnih s tehniko RT-PCR lahko razložimo z dejstvom, da s to metodo zaznamo zelo majhno število kopij virusa v vzorcu ali celo le RNK že neaktivnega, razgrajenega virusa, ki se v celični kulturi ne more več replicirati. Z metodo RT-PCR smo kot pozitivne določili 88 vzorcev več kot bi jih, če bi uporabili le metodo ELISA in iz njih uspeli pridobiti še 13 izolatov virusov. Pridobivanje izolatov ima velik pomen za določanje sevov predvsem pri virusih influence.



Slika 3. Razporeditev pozitivnih rezultatov glede na uporabljene metode
Figure 3. Distribution of positive results according to the used methods



Slika 4. Uspešnost izolacije virusov v celični kulturi glede na uporabljeno presejalno metodo
Figure 4. Virus isolation efficiency according to the used screening method

V literaturi navajajo delež detekcije virusov influence med 80% in 100% (2, 7), vendar gre za vzorce, ki jih nanesejo v celično kulturo največ 2 uri po odvzemu. Ker so v naši raziskavi sodelovali zdravniki iz vse Slovenije, ki so zajeti v mreži za epidemiološko in virološko spremljanje gripe, so bili vzorci v laboratorij dostavljeni tudi dva dni po odvzemu. S podaljševanjem časa od odvzema brisa do inokulacije v celično kulturo se zmanjšuje verjetnost uspešnosti namnožitve virusa (1).

Stopnja detekcije virusov z obema metodama smo primerjali po starostnih skupinah (Slika 2). Ugotovili smo, da je metoda RT-PCR bolj občutljiva od metode ELISA v vseh starostnih skupinah in da se razlika v višjih starostnih skupinah povečuje v prid metode RT-PCR. Posebej je opazno povečanje možnosti detekcije virusov influence in RSV z metodo RT-PC v starostnih skupinah nad 5 let. V starostni skupini od 0 do 4 let je stopnja detekcije z metodo RT-PCR višja za 7,1%, v starostni skupini od 5 do 9 let pa že za 15,6%. Podoben skok v razliki med občutljivostjo obeh metod so opazili v avstrijski študiji (7), čeprav uporabljeni tehniki nista bili popolnoma enaki. V avstrijski študiji je v starostni skupini od 0 do 4 let metoda RT-PCR za okoli 10 % bolj občutljiva, v starostni skupini od 5 do 19 let pa 30% bolj občutljiva od metode ELISA. Razliko bi lahko pripisali dejstvu, da je za detekcijo virusov influence z metodo ELISA potrebna večja količina virusa v vzorcu kot za metodo PCR, kar so dokazali s primerjalnim testiranjem različnih koncentracij razmnoženih virusov (7). V zgomijih dihal otrok je večja količina virusa influence in tudi prisoten je dlje časa kot pri odraslih, kar potrjujejo raziskave, v katerih so sledili prisotnosti virusov influence po cepljenju v izpirkih nosu odraslih in otrok (8, 9). Pri otrocih so viruse v izpirkih nosu odkrili še po dveh tednih in več, pri odraslih pa ne več kot en teden po cepljenju (10, 11).

Pri izbiri presejalne metode za odkrivanje virusov influence in RSV v brisih nosu in žrela je torej pomemben dejavnik tudi starost bolnika. Za presejanje bi bilo idealno uporabiti obe proučevani metodi, vendar bi bilo to preveč zamudno in predrago. Kot presejalno metodo smo izbrali RT-PCR, saj smo ugotovili, da je njena občutljivost bistveno višja kot občutljivost metode ELISA, in da se z uporabo te metode poveča tudi stopnja uspešnih osamitev virusov v celičnih kulturah. Slabosti izbrane metode sta višja cena in višja zahtevnost izvedbe. Pomemben dejavnik za izboljšanje občutljivosti vseh metod bi bil tudi krajši čas potovanja vzorcev do laboratorija.

Literatura

1. Zambon M. Laboratory Diagnosis of Influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. *Textbook of Influenza*, Oxford: Blackwell Science, 1998:291-313.
2. Atmar RL, Baxter BD, Dominiguez EA, Taber LH. Comparison of Reverse Transcription-PCR with Tissue Culture and Rapid Diagnostic Assays for Detection of Type A Influenza Virus. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10): 2604-2606.
3. Habib-Benin NF, Beckwith III WH, Mayo D, Landry ML. Comparison of SmartCycler Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay in a Public Health Laboratory with Direct Immunofluorescence and Cell Culture Assays in a Medical Center for detection of Influenza A Virus. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8): 3597-3601.
4. Pregliasco F, Mensi C, Camorali L, Anselmi G. Comparison of RT-PCR With other Diagnostic Assays for Rapid Detection of Influenza Viruses. *J Med Virol* 1998; 56: 168-173.
5. Gröndahl B, Puppe W, Hoppe A, Kühne I, Weigl JAI, Schmidt HJ. Rapid Identification of Nine Microorganisms Causing Acute Respiratory Tract Infections by Single-Tube Multiplex Reverse Transcription-PC: Feasibility Study. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 1-7.
6. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Medical Microbiology*. 29th ed. Connecticut: Appelton & Lange, 1995.
7. Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of Reverse Transcription-PCR, Virus Isolation, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Influenza A Virus Infection in Different Age Groups. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 2051-2056.
8. Belshe RB, Van Voris LP. Cold-recombinant influenza A/California/10/78 (H1N1) virus vaccine (CR-37) in seronegative children: infectivity and efficacy against investigational challenge. *J Infect Dis* 1984; 149: 735-740.
9. Lazar A, Okabe N, Wright PF. Humoral and cellular immune responses of seronegative children vaccinated with a cold-adapted influenza A/HK/123/77 (H1N1) recombinant virus. *Infect Immun* 1980; 27: 862-866.
10. Clements ML, Snyder MH, Sears SD, Maassab HF, Murphy BR. Evaluation of the infectivity, immunogenicity, and efficacy of live cold-adapted influenza B/Ann Arbor/1/86 reassortant virus vaccine in adult volunteers. *J Infect Dis* 1990; 161: 869-877.
11. Murphy BR, Chalhub EG, Nusinoff SR, Kasel J, Chanock RM. Temperature-sensitive mutants of influenza virus. 3. Further characterization of the ts-1(E) influenza A recombinant (H3N2) virus in man. *J Infect Dis* 1973; 128: 479-487.