

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Gregor KLJUČEVŠEK

PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE
DNA V POSTOPKU DOKAZOVANJA OKUŽB S
ČLOVEŠKIM VIRUSOM CITOMEGALIJE

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Gregor KLJUČEVŠEK

PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE DNA V
POSTOPKU DOKAZOVANJA OKUŽB S ČLOVEŠKIM VIRUSOM
CITOMEGALIJE

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

COMPARISON OF MANUAL AND AUTOMATIC DNA EXTRACTION
METHODS IN THE PROCESS OF DETECTION OF HUMAN
CYTOMEGALOVIRUS INFECTIONS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Maria Poljaka, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

Mentor: prof. dr. Mario Poljak

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mario POLJAK, dr. med.

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

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

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

Datum zagovora:

Gregor Ključevšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD

DK UDK 579.7.083 : 577.2.08 (043)=863

KG citomegalovirus / molekularna diagnostika / ročna izolacija DNA / avtomatska izolacija DNA / kvantifikacija DNA

AV KLJUČEVŠEK, Gregor

SA POLJAK, Mario (mentor)/SEME, Katja (recenzentka)

KZ Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije

LI 2007

IN PRIMERJAVA ROČNE IN AVTOMATSKE IZOLACIJE DNA V POSTOPKU DOKAZOVANJA OKUŽB S ČLOVEŠKIM VIRUSOM CITOMEGALIJE

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP X, 30 str., 4 pregl., 7 sl., 1 pril., 7 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Virus človeške citomegalije (CMV) je najpomembnejši virusni povzročitelj okužb pri imunsko oslabljenih osebah. Poleg tega, da povzroča resne okvare pri novorojenčkih, povzroča širok spekter nepravilnosti tudi pri nekoliko starejših otrocih in odraslih: od asimptomatske, subklinične okužbe, do mononukleoze pri zdravih posameznikih in do raztresene oblike obolenja pri imunsko oslabljenih pacientih. Za odkrivanje okužb s tem virusom se poleg klasičnih uporabljajo tudi molekularne metode, ki omogočajo detekcijo že zelo majhnih količin virusa, ko le ta sploh še ne povzroča bolezni. Namen naše raziskave je bil ugotoviti ali je mogoče v postopku kvantitativnega dokazovanja CMV DNA zamenjati standardno ročno metodo izolacije DNA z avtomatsko. V raziskavo smo vključili 129 kliničnih vzorcev plazme, ki so bili poslani v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisa in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Ugotovili smo, da je ročno izolacijo CMV DNA mogoče zamenjati z avtomatsko, pri tem pa se dobljeni rezultati razlikujejo v dovoljenih mejah. Prednosti avtomatske izolacije so zmanjšana možnost kontaminacije, večja primerljivost rezultatov, ponovljivost rezultatov in prihranek pri količini vložene delo potrebnega za samo izolacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN

DC UDC 579.7.083 : 577.2.08 (043)=863

CX cytomegalovirus / molecular diagnostic / manual DNA isolation / automatic DNA isolation / DNA quantification

AU KLJUČEVŠEK, Gregor

AA POLJAK, Mario (supervisor)/SEME, Katja (reviewer)

PP Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2007

TI COMPARISON OF MANUAL AND AUTOMATIC DNA EXTRACTION METHODS IN THE PROCESS OF DETECTION OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTIONS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 30 p., 4 tab., 7 fig., 1 ann., 7 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Human cytomegalovirus (CMV) is the most important cause of infections at immunocompromised people. In addition to inducing severe birth defects, CMV causes a wide spectrum of disorders in older children and adults, ranging from an asymptomatic, subclinical infection to a mononucleosis syndrome in healthy individuals to disseminated disease in immunocompromised patients. For detecting Human cytomegalovirus (CMV) classical and molecular methods are being used. Molecular methods allow detection of very small amount of virus that does not cause a disease yet. To find out if it is possible to replace the standard manual isolation of DNA with the automatic isolation in the quantitative analysis of the DNA of CMV was the main intention of our research. In our research, we included 129 clinical samples of plasma. These samples were sent to Laboratory for molecular microbiology and diagnosis of hepatitis and AIDS at the Institute of Microbiology and Immunology belonging to Medical Faculty in Ljubljana. We came to the conclusion that there is possibility to replace manual isolation of the DNA of CMV with automatic isolation. Differences between these two methods are within allowed limits. Benefits of automatic isolation are reduction of contamination, higher comparability of results, repeatability of results and saving of the amount of work invested in isolation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 Namen dela	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 VIRUS ČLOVEŠKE CITOMEGALIJE	2
2.1.1 Odkritje CMV in njegova taksonomska uvrstitev	2
2.1.2 Zgradba CMV	2
2.1.3 Patogeneza	3
2.1.3.1 Pri zdravih gostiteljih	3
2.1.3.2 Pri imunsko oslabljeni gostiteljih	3
2.1.3.3 Podedovane in obporodne okužbe	4
2.1.4 Patologija	4
2.1.5 Klinični znaki obolenja	5
2.1.5.1 Pri zdravih gostiteljih	5
2.1.5.2 Pri imunsko oslabljeni gostiteljih	5
2.1.5.3 Podedovane in obporodne okužbe	6
2.1.6 Imunski odziv na okužbo	6
2.1.7 Epidemiologija	7
2.1.8 Zdravljenje in nadzor okužbe	8

2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S CMV	9
2.2.1 Posredna diagnostika	9
2.2.1.1 Serologija	9
2.2.2 Neposredna diagnostika	9
2.2.2.1 Izolacija virusa	9
2.2.2.2 Odkrivanje virusnih antigenov	10
2.2.2.3 Molekularne diagnostične metode	10
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 PLAZEMSKI VZORCI	13
3.2 IZOLACIJA DNA IZ PLAZEMSKIH VZORCEV	13
3.2.1 Ročna izolacija	13
3.2.2 Avtomatska izolacija	17
3.3 KVANTIFIKACIJA IZOLIRANE CMV DNA	19
3.3.1 Priprava mešanice za RT PCR	19
3.3.2 RT PCR	20
3.3.3 Določanje koncentracije CMV DNA v vzorcih	20
3.4 STATISTIČNA OBDELAVA POZITIVNIH REZULTATOV	21
4 REZULTATI	23
4.1 VZPOREDNA IZOLACIJA DNA	23
4.2 NEVZPOREDNA IZOLACIJA DNA	23
4.3 VSI VZORCI	23
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	27
5.1 PRIMERJAVA DVEH METOD ZA IZOLACIJO VIRUSNE DNA	27
5.2 SKLEPI	28
6 POVZETEK	29

7 VIRI	30
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava uspešnosti izolacije DNA z uporabo ročne in avtomatske metode (n=129).	24
Preglednica 2: Logaritmi koncentracij DNA v vzorcih, kjer je bila izolacija DNA z eno metodo izolacije uspešna, z drugo pa ne (n=14).	24
Preglednica 3: Podatki o vzorcih, kjer je bila razlika v logaritmu koncentracij DNA večja ali enaka 0,5 (n=15).	25
Preglednica 4: Deleži pozitivnih vzorcev, kjer je bila razlika v logaritmu koncentracije DNA večja oziroma manjša od 0,5 (n=64).	26

KAZALO SLIK

Slika 1: BioRobot EZ-1.	11
Slika 2: Dodajanje pufra v QIAamp Spin Column.	15
Slika 3: Shematski prikaz poteka ročne izolacije.	16
Slika 4: Trak z reagenti, potrebnimi za izolacijo DNA.	17
Slika 5: Potek pipetiranja v aparatu BioRobot EZ-1.	18
Slika 6: Shematski prikaz poteka avtomatske izolacije.	19
Slika 7: Primerjava logaritmiranih vrednosti koncentracij CMV DNA pridobljenih z avtomatsko in ročno izolacijo.	26

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CMV	virus človeške citomegalije
DNA	deoksiribonukleinska kislina
LC PCR	metoda verižne reakcije s polimerazo, ki za delovanje potrebuje aparat LightCycler [®]
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RT PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času

1 UVOD

Virus človeške citomegalije (CMV, angl. *human cytomegalovirus*) je najpomembnejši virusni povzročitelj okužb pri imunsko oslabljenih osebah, prizadene pa lahko ljudi v vseh starostnih skupinah. Poleg tega, da povzroča resne okvare pri novorojenčkih, povzroča širok spekter nepravilnosti tudi pri nekoliko starejših otrocih in odraslih: od asimptomatske, subklinične okužbe, do infekcijske mononukleoze pri zdravih posameznikih in do raztresene oblike obolenja pri imunsko oslabljenih pacientih.

Za odkrivanje okužb s tem virusom se poleg klasičnih uporabljajo tudi molekularne metode, ki omogočajo detekcijo že zelo majhnih količin virusa ko le ta največkrat še ne povzroča bolezni. Zaradi te prednosti so molekularne metode zelo uporabne v postopkih pred presaditvami organov in pa tudi po njih, ko se spremlja količina virusa v bolniku in s tem tudi uspešnost zdravljenja. Pomembna pa je tudi njihova uporaba v diagnostiki okužbe pri imunsko oslabljenih odraslih in otrocih, ki še nimajo zadosti razvitega imunskega sistema in zato serološke metode niso uporabne, ukrepati pa je potrebno hitro.

1.1 NAMEN DELA

V diplomskem delu smo želeli s primerjavo dveh metod izolacije DNA iz vzorcev plazme ugotoviti, ali je mogoče v postopku kvantitativnega dokazovanja CMV DNA zamenjati standardno ročno metodo izolacije DNA z avtomatsko.

Pričakovali smo, da bosta obe metodi izolacije DNA enako učinkoviti. Zaradi zmanjšanja količine vložene dela v sam postopek izolacije in manjše možnosti kontaminacije naj bi avtomatska metoda izolacije DNA uspešno nadomestila standardno ročno metodo izolacije DNA pri postopku kvantitativnega dokazovanja CMV DNA v vzorcih plazme.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VIRUS ČLOVEŠKE CITOMEGALIJE

2.1.1 Odkritje CMV in njegova taksonomska uvrstitvev

CMV, virus ki so ga najprej izolirali iz kužnin bolnikov s kongenitalno boleznijo citomegalovirusnih inkluzij, je sedaj prepoznan kot pomemben patogen v vseh starostnih skupinah. Poleg tega, da povzroča resne okvare pri novorojenčkih, povzroča širok spekter nepravilnosti tudi pri nekoliko starejših otrocih in odraslih: od asimptomatske, subklinične okužbe, do infekcijske mononukleoze pri zdravih posameznikih in do raztresene oblike obolenja pri imunsko oslabljenih pacientih. Je vrstno specifičen virus, ki pri različnih organizmih povzroča podobne bolezni. Pri vseh pa je značilen pojav močno povečanih celic – od tod ime virus človeške citomegalije (Hirsch, 2005).

CMV spada v virusno družino *Herpesviridae*, poddružino *Betaherpesvirinae* in rod *Cytomegalovirus*. Uradno ime je humani herpesvirus 5 (HHV-5), pogosto pa se še vedno uporablja izraz virus človeške citomegalije (Brooks in sod., 2004).

2.1.2 Zgradba CMV

Virus ima dvojno-vijačno DNA, štiri vrste mRNA, beljakovinsko sredico in lipoproteinsko ovojnico. Kot ostali herpesvirusi, tudi CMV izkazuje ikozaedrično simetrijo, pomnožuje se v jedru celice in lahko povzroči litično in s tem produktivno okužbo ali pa asimptomatično okužbo. Virusno pomnoževanje je povezano s produkcijo velikih znotraj jedrnih vključkov in manjših citoplazmatskih vključkov. Virus se v *in vivo* pogojih lahko pomnožuje v številnih celicah, v celičnih kulturah pa večinoma raste na fibroblastih. Čeprav je malo dokazov, da bi bil virus v *in vivo* pogojih onkogen, v določenih primerih virus transformira fibroblaste, ti transformirani deli na genomu pa so bili tudi prepoznani (Hirsch, 2005).

CMV ima med herpesvirusi največji genom (240 kbp). Okarakteriziranih je bilo le nekaj beljakovin izmed več kot 200, ki so zapisane v genomu virusa. Ena izmed njih, površinski glikoprotein, se obnaša kot Fc receptor, ki se lahko nespecifično

veže na Fc del imunoglobulinov. To pomaga okuženim celicam, da se lahko izognejo odstranitvi s strani imunskega sistema tako, da na površini celice ustvarja za gostitelja nepomembne imunoglobuline (Brooks in sod., 2004).

Čeprav med človeško populacijo krožijo številni genetsko različni sevi CMV, to ne vpliva na vrsto povzročene bolezni, saj so si ti sevi antigensko zelo podobni (Brooks in sod., 2004).

2.1.3 Patogeneza

2.1.3.1 Pri zdravih gostiteljih

CMV se iz človeka na človeka prenaša z neposrednim kontaktom. Po izpostavitvi virusu je inkubacijska doba pri normalnih otrocih in odraslih 4 do 8 tednov. Virus povzroča sistemsko okužbo in je bil izoliran iz pljuč, jeter, požiralnika, debelega črevesa, ledvic, monocitov, T in B limfocitov. Bolezen je infekcijski mononukleozi podoben sindrom, čeprav je večina okužb subkliničnih. Tako kot vsi herpesvirusi, tudi CMV ostane vse življenje prisoten v organizmu. Po primarni okužbi je virus lahko več mesecev ali pa celo let skrit v žrelu in urinu. Daljša prisotnost CMV v ledvicah ni škodljiva v normalnih osebkih. Prisotnost virusa v žlezah slinavkah pa je verjetno kronična (Brooks in sod., 2004).

Ob primarni okužbi je celični imunski odziv zaustavljen in to omogoča ohranjanje virusne okužbe v organizmu. Potrebni je kar nekaj mesecev, da si imunski sistem opomore (Brooks in sod., 2004).

2.1.3.2 Pri imunsko oslabljeni gostiteljih

Primarne CMV okužbe so pri teh ljudeh veliko hujše kot pri zdravih osebkih. Osebe z večjim tveganjem za bolezen povzročeno s strani CMV so tiste, ki so prestale presaditev organa, imajo maligni tumor in prejemajo kemoterapijo in tiste z aidsom. Virusno izločanje je povečano in podaljšano, okužba pa lažje postane raztresena po organizmu. Pljučnica pa je najpogostejši zaplet pri tej okužbi (Brooks in sod., 2004).

V seropozitivnih posameznikih imunski odziv ohranja CMV v mirujočem stanju. Reaktivacije okužbe so veliko bolj pogoste pri imunsko oslabljenih ljudeh kot pa pri zdravih gostiteljih. Vendar pa so reaktivacije navadno milejše kot primarne okužbe (Brooks in sod., 2004).

2.1.3.3 Podedovane in obporodne okužbe

Okužbe zarodkov in novorojenčkov s CMV so lahko zelo resne. V Združenih državah Amerike je okoli 1 % novorojenih otrok okuženih s tem virusom. Od teh jih 5-10 % tudi zbolijo. Velik delež okuženih otrok ima motnje v razvoju, tako fizičnem kot psihičnem (Brooks in sod., 2004).

Virus lahko pride v maternico ob primarni okužbi ali pa ob reaktivaciji okužbe pri materi. Pri približno eni tretjini primarno okuženih materah se virus prenese v maternico, ni pa znano, da bi stadij nosečnosti vplival na pojav bolezni pri zarodku. Znotraj maternični prenos virusa na otroka se zgodi pri 1 % seropozitivnih mater. Poškodbe, zaradi reaktivacije pri materi, so na zarodku redke. Okužba je tako subklinična, a kronična (Brooks in sod., 2004).

Otrok se lahko z virusom okuži tudi ob samem porodu, v porodnem kanalu, ali pa kasneje ob hranjenju z materinim mlekom. V teh primerih otrok navadno od matere dobi tudi nekaj protiteles in zato so te okužbe ponavadi subklinične. Virus se lahko prenese na otroka tudi s transfuzijo krvi, vendar pa je potek take okužbe odvisen od količine prejetega virusa in pa od serološkega statusa darovalca krvi. Torej, če se novorojenček okuži pred porodom v maternici ali pa ob porodu, so posledice hujše, kot pa če se okuži kasneje v življenju (Brooks in sod., 2004).

2.1.4 Patologija

S CMV okužene epiteljske celice so dva do štiri krat večje kot okoliške celice in navadno v jedru vsebujejo 8 do 10 µm velik vključek, ki je nameščen ekscentrično in je obdan z bistrim obročem. Občasno se pojavijo tudi manjši citoplazemski vključki. S CMV okužene celice lahko najdemo v številnih organih: v žlezah

slinavke, pljučih, ledvicah, jetrih, prebavnem traktu, trebušni slinavki, nadledvični žlezi (Hirsch, 2005).

Celični vnetni odziv je sestavljen iz plazemskih celic, limfocitov in monocitov. V jetrih se pogosto tvorijo granulomi. Imunopatološke reakcije lahko botrujejo boleznim, ki jo povzroči CMV. V okuženih dojenčkih so opazili imunske komplekse, včasih v povezavi z boleznimi glomerulov, ki jih povzroča CMV. Ti kompleksi so bili opaženi pri nekaterih s CMV okuženih pacientih po presaditvi ledvic (Hirsch, 2005).

2.1.5 Klinični znaki obolenja

2.1.5.1 Pri zdravih gostiteljih

Primarna okužba s CMV pri starejših otrocih in odraslih navadno poteka asimptomatsko. Občasno pa lahko povzroči mononukleozni sindrom. Bolezen se odraža z občutkom slabosti, mišičnim obolenjem, podaljšano vročino, nepravilnim delovanjem jeter in limfocitozo (Brooks in sod., 2004).

Citomegalovirusna mononukleozna je mila bolezen, zapleti pa so redki. Pogost je hepatitis z blagim potekom obolenja. Pri otrocih, mlajših od 7 let, pa je pogosto opažena hepatosplenomegalija (Brooks in sod., 2004).

Opazena je bila tudi povezava med prisotnostjo CMV in ponovno zožitvijo koronarne arterije, ki lahko sledi predhodni razširitvi le te z operativnim posegom. Predvidevajo, da virus pomaga pri namnožitvi gladkih mišičnih celic, kar vodi v zožitev arterije (Brooks in sod., 2004).

2.1.5.2 Pri imunsko oslABLjeni gostiteljih

Pri imunsko oslABLjenih ljudeh se zaradi primarne ali ponovljene okužbe s CMV smrtnost poveča. Pogost zaplet pri okužbi je pljučnica. Intersticijski pneumonitis, povzročen s CMV, se pojavi pri 10 – 20 % bolnikov po presaditvi kostnega mozga. Virusno povezana leukopenija je pogosta pri bolnikih, ki so prestali presaditev

organa. Pogost je tudi hudi bronhiolitis pri bolnikih po presaditvi pljuč, ateroskleroza pri ljudeh po presaditvi srca in s CMV povezana zavrnitev transplantirane ledvice. CMV pogosto povzroči tudi raztreseno obolenje pri nezdravljenih bolnikih z aidsom. Tudi gastroenteritis in horioretinitis sta pogosti težavi, slednji pogosto vodi v progresivno slepoto (Brooks in sod., 2004).

2.1.5.3 Podedovane in obporodne okužbe

Okužba zarodka lahko vodi v njegovo smrt. Citomegalovirusna inkluzijska bolezen novorojenčkov je navadno povezana z okvarami v centralno živčnem sistemu in retikuloendotelijskem sistemu. Klinični znaki pa so znotraj maternična zaostalost v rasti, zlatenica, hepatosplenomegalija, trombocitopenija, mikrocefalija in retinitis. Smrtnost se lahko povzpne na 30 %. Večina preživelih pa v prvih dveh letih življenja razvije hude napake v centralnem živčnem sistemu. Pogosta je izguba sluha, težave z vidom in mentalna zaostalost. 10 % novorojenčkov s subklinično CMV okužbo ogluši.ocene v ZDA kažejo na to, da je eden na 1000 rojenih otrok zaostal zaradi podedovane CMV okužbe (Brooks in sod., 2004).

Pri veliko ženskah, predhodno okuženih s CMV, pride med nosečnostjo do njegove reaktivacije in izločanja iz materničnega vratu. Ob porodu pa se novorojenček lahko ob prehodu skozi okužen porodni kanal tudi sam okuži, čeprav vsebuje veliko količino materinih protiteles, ki jih je pridobil preko posteljice. Ta otrok začne po 8 – 12 tednih izločati virus. Kljub temu, da se to izločanje nadaljuje še naprej, lahko tudi več let, pa otrok ostaja zdrav (Brooks in sod., 2004).

Tako pridobljena okužba s CMV je pogosta in navadno neopazna. Virus se lahko več tednov ali mesecev ohranja v slini in urinu okuženega, nato pa je lahko vzrok pljučnice pri otrocih starih manj kot 6 mesecev (Brooks in sod., 2004).

2.1.6 Imunski odziv na okužbo

Pri večini ljudi se po okužbi s CMV v serumu pojavijo protitelesa. Zaznati je mogoče protitelesa razredov IgM, IgA in IgG. Reaktivacija asimptomatične okužbe se pojavi ob prisotnosti normalno delujočega imunskega sistema. Prisotnost

protiteles v materinem mleku ne prepreči prenosa virusa na novorojenčka, ki se hrani s tem mlekom. Ta protitelesa bolj ščitijo novorojenčka pred razvojem resne bolezni, kot pa pred samim prenosom virusa (Brooks in sod., 2004).

2.1.7 Epidemiologija

CMV je prisoten povsod po svetu. Približno 1 % novorojenčkov v ZDA je okuženih s CMV, v manj razvitih državah pa je ta delež višji. Življenje v skupnosti in slaba osebna higiena pospešujeta zgodnje širjenje virusa. Obporodne in okužbe v kratkem času po rojstvu so pogoste. Virus je lahko prisoten v materinem mleku, slini, fecesu in urinu. Prenos CMV so opazili med otroki v vrtcih in so ga sledili od okuženega otroka, ki je komaj shodil, do noseče matere in naprej na razvijajoči se zarodek. Ko okužen otrok prinese CMV v domače okolje, 50 % članov družine, ki so dojemljivi za okužbo, v šestih mesecih razvije protitelesa (Hirsch, 2005).

Za prenos virusa iz osebe na osebo ni dovolj zgolj kratek, bežen kontakt, ampak je potreben dolgotrajen tesen stik. V obdobju pozne mladosti in zgodnje odraslosti se CMV prenaša predvsem s spolnim kontaktom. Virus se pogosto ohranja v spermii in izločkih materničnega vratu ter ne povzroča kliničnih znakov pri okuženi osebi. Protitelesa proti CMV so zaznali pri skoraj vseh prostitutkah in spolno aktivnih homoseksualcih. Spolno aktivni odrasli lahko hkrati nudijo zavetje večim različnim sevom CMV. Virus pa se lahko prenaša tudi s transfuzijo krvi ali pa le delov krvi, ki vsebujejo levkocite in to s pogostostjo 0,14 do 10 % na enoto transfuzije (Hirsch, 2005).

Ko je človek enkrat okužen s CMV, navadno nosi ta virus v sebi vse življenje. Okužba ponavadi ostane prikrita. Ko pa je enkrat T limfocitni imunski odziv oslavljen pa pride do reaktivacije virusa in značilnih kliničnih znakov. To se lahko zgodi po presaditvi organa ali v povezavi s celičnim tumorjem in nekaterimi pridobljenimi pomanjkljivostmi pri delovanju imunskega sistema (okužba z virusom HIV). Večina primarnih okužb s CMV pri pacientih po transplantaciji se zgodi zaradi prenosa virusa v samem transplantatu. Pri CMV seropozitivnih ljudeh, ki prestopajo transplantacijo, pa se okužba lahko kaže kot reaktivacija prikrite

okužbe ali pa kot ponovna okužba z novim sevom virusa. Okužba s CMV pa je verjetno povezana tudi z zoženjem srčne arterije, ki lahko sledi presaditvi srca ali pa operativni razširitvi le te, vendar pa ta trditev zahteva nadaljnjo preverjanje (Hirsch, 2005).

2.1.8 Zdravljenje in nadzor okužbe

Zdravljenje okužbe s CMV z zdravili je dalo nekaj vzpodbudnih rezultatov. Ganciklovir, ki je nukleozid in strukturno podoben aciklovirju, je bil uspešno uporabljen za zdravljenje življenjsko ogrožujočih okužb s CMV pri imunsko oslabljenih bolnikih. Tudi resnost s CMV povzročene retinitisa, ezofagitisa in kolitisa je bila zmanjšana z uporabo ganciklovirja. S predhodnim zdravljenjem z ganciklovirjem se zmanjša tudi pojavnost CMV pljučnice pri bolnikih po presaditvi kostnega mozga. Ganciklovir pa tudi kontrolira nadaljevanje izgube sluha pri novorojenčkih s podedovano okužbo. Foscarnet, analog anorganskega pirofosfata, je priporočen za zdravljenje s CMV povzročene retinitisa. Aciklovir in valaciclovir pa sta pokazala določen učinek pri bolnikih po presaditbi kostnega mozga in ledvic (Brooks in sod., 2004).

Za preprečevanje širjenja CMV ni predpisan točno določen postopek, je pa priporočena osamitev okuženih novorojenčkov od ostalih (Brooks in sod., 2004).

Presejalna analiza darovalcev transplantatov in prejemnikov le teh za CMV protitelesa lahko prepreči morebiten primaren prenos CMV. Tisti prejemniki organov, ki so CMV seronegativni, predstavljajo visoko rizično skupino za okužbo s CMV (Brooks in sod., 2004).

Za otroke, ki potrebujejo infuzijo krvi, je priporočeno, da je le ta iz seronegativnih darovalcev. Ta pristop prepreči morebitno okužbo s CMV, vendar pa je take darovalce težko najti (Brooks in sod., 2004).

Tako živa kot rekombinantna CMV cepiva pa so že v razvoju (Brooks in sod., 2004).

2.2 DIAGNOSTIKA OKUŽBE S CMV

Diagnoze, da gre za okužbo s CMV, ni mogoče postaviti zgolj na podlagi kliničnih znakov. V diagnostiki okužbe s CMV uporabljamo posredne in neposredne metode.

2.2.1 Posredna diagnostika

2.2.1.1 Serologija

Obstajajo številne metode za odkrivanje CMV IgG protiteles, ki so pokazatelj pretekle okužbe in kažejo na možnost reaktivacije. Odkritje IgM protiteles pa kaže na trenutno aktivno okužbo. Serološke metode ne pridejo v poštev pri imunsko oslabljenih ljudeh, saj imajo le ti moteno proizvodnjo protiteles. Te metode pa tudi niso uporabne za določanje razlik med sevi iz različnih kliničnih izolatov (Brooks in sod., 2004). Tu so v uporabi naslednje metode: reakcija vezave komplemента, aglutinacijski test in encimskoimunska metoda (Sia in Patel, 2000).

2.2.2 Neposredna diagnostika

2.2.2.1 Izolacija virusa

Viremijo se lahko ugotavlja s kultiviranjem primernih vzorcev na eni plasti človeških fibroblastov. Če je viremija visoka, kot je to navadno pri podedovani raztreseni okužbi in pri bolnikih z aidsom, so značilni citopatski efekti opazni v nekaj dneh. Pri CMV mononukleozi, kjer so koncentracije virusa majhne, pa je citopatski efekt opazen šele po nekaj tednih. Mnogi laboratoriji pospešijo ta način diagnostike z metodo "shell vial", ki vključuje centrifugiranje in imunocitokemijsko dokazovanje, kjer se uporabi monoklonska protitelesa proti zgodnjim CMV antigenom. Izolacija virusa iz urina in sline ne kaže na akutno okužbo, saj se tu virusno izločanje nadaljuje še več mesecev ali celo let po sami bolezni zaradi CMV. Dokazovanje virusne viremije je boljši pokazatelj akutne okužbe (Hirsch, 2005).

2.2.2.2 Odkrivanje virusnih antigenov

Odkrivanje virusnih antigenov (pp65) v levkocitih periferne krvi ali virusne DNA v krvi ali tkivih lahko pri določenih populacijah pospeši diagnozo okužbe s CMV. To velja za bolnike po presaditvi organa in bolnike z aidsom. Taka analiza lahko da pozitiven rezultat nekaj dni pred metodo izolacije virusa s celičnimi kulturami (Hirsch, 2005). Ta način diagnostike se izvaja z neposredno imunofluorescenčno ali imunohistokemično metodo (Sia in Patel, 2000).

2.2.2.3 Molekularne diagnostične metode

Najbolj občutljiva metoda za odkrivanje CMV v krvi ali v drugih tekočinah je pomnoževanje CMV DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*). Pomnoževanje CMV DNA v krvi s PCR metodo in nato kvantifikacija le te lahko napove tveganje za razvoj bolezni. Z odkritjem CMV DNA v cerebrospinalni tekočini pa lahko diagnosticiramo encefalitis (vnetje možganov) ali poliradikulitis (vnetje več živčnih korenin) povzročen s strani CMV (Hirsch, 2005).

Kvantitativno določanje CMV DNA se uporablja predvsem za ugotavljanje kateri imunsko oslabei (zlasti transplantirani) bolniki potrebujejo t.i. predizpraznitveno specifično protivirusno zdravljenje (angl. *preemptive therapy*), v primeru ko le ti sicer že imajo v sebi virus, vendar pa le ta še ne povzroča bolezni. S tem se lahko reši marsikaterega bolnika, saj se z zdravljenjem prične še preden se pojavijo bolezenski znaki, ki lahko tudi ogrozijo človekovo življenje. Uporablja pa se tudi za spremljanje učinkovitosti protivirusnega zdravljenja okužbe s CMV. Pomembno je, da se ne zdravi vseh bolnikov po vrsti ampak le tiste, z virološko dokazano veliko ogroženostjo za razvoj klinično izražene okužbe s CMV (Sia in Patel, 2000). S tem manj bolnikov (po nepotrebem) prejema protivirusna zdravila, in še ti krajši čas, kar pripomore k zmanjšanju pojavnosti stranskih učinkov in virusnih sevov, odpornih proti protivirusnim zdravilom (Zaia, 2002).

Za to metodo je najprej potrebno izolirati virusno DNA. To danes lahko storimo ročno ali pa avtomatsko. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisa in aidsa, so do nedavnega to počeli ročno, z uporabo standardne metode QIAamp® UltraSens™ Virus Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), sedaj pa bi to metodo radi zamenjali z avtomatsko metodo na aparatu BioRobot EZ-1 (Qiagen, Hilden, Nemčija), EZ-1 Virus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) (Slika 1).



Slika 1: BioRobot EZ-1.

Poleg aparata BioRobot EZ-1, za avtomatsko izolacijo DNA obstajajo še številni drugi inštrumenti, med katerimi pa so najpogosteje uporabljeni MagNA Pure LC sistem (Roche Applied Science, Indianapolis, ZDA) in pa MagNA Pure Compact (Roche Applied Science, Indianapolis, ZDA). MagNA Pure LC sistem omogoča poleg izolacije tudi avtomatsko pripravo izolirane DNA za nadaljnjo obdelavo z metodo LC PCR (Stöcher in sod., 2004).

Izolaciji DNA sledi pomnoževanje delcev izolirane CMV DNA. To lahko storimo na več načinov. V rutinski uporabi sta predvsem naslednja diagnostična kompleta: COBAS AMPLICOR™ CMV MONITOR Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) in Artus CMV LC PCR Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija), ki pa za svoje delovanje potrebuje še aparat LightCycler® (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija). Slednji se uporablja tudi v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisa in aidsa.

COBAS AMPLICOR™ CMV MONITOR Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) izmeri koncentracijo virusa le na koncu pomnoževanja CMV DNA, ko se na denaturirano DNA vežejo še specifične lovke. Koncentracijo prob vezanih na pomnoženo DNA se nato izmeri s pomočjo spektrofotometra (Piiparinen in sod., 2004).

Artus CMV LC PCR Kit deluje po principu PCR v realnem času (RT PCR, angl. *real time PCR*). Pri tej metodi se produkte pomnoževanja zazna s pomočjo fluorescentnih barvil, ki so vezana na oligonukleotidne lovke, katere se specifično vežejo na pomnoževano zaporedje. Merjenje fluorescence poteka že med samim pomnoževanjem in nam tako po končanem PCR ni potrebno znova odpirati reakcijskih tubic, da bi izmerili fluorescenco in tako kvantificirali pomnoženo DNA.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PLAZEMSKI VZORCI

V raziskavo je bilo vključenih 129 kliničnih vzorcev plazme, ki so v letu 2006 prispeli na analizo prisotnosti CMV DNA v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisa in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, ki deluje pod okriljem Medicinske fakultete v Ljubljani.

Izbrani so bili vzorci, ki so vsebovali vsaj 600 µl plazme, kar je bil minimalen volumen potreben za ročno in avtomatsko izolacijo virusne DNA. Če ni bilo na voljo toliko vzorca, le ta ni bil vključen v nadaljnjo analizo.

Iz 81 vzorcev smo CMV DNA vzporedno izolirali z ročno in avtomatsko izolacijo. 48 vzorcev pa je bilo prej zamrznjenih, saj smo DNA ročno izolirali že pred časom, sedaj pa smo jih samo odmrznili in DNA izolirali še z avtomatsko metodo in nato primerjali obe metodi.

3.2 IZOLACIJA DNA IZ PLAZEMSKIH VZORCEV

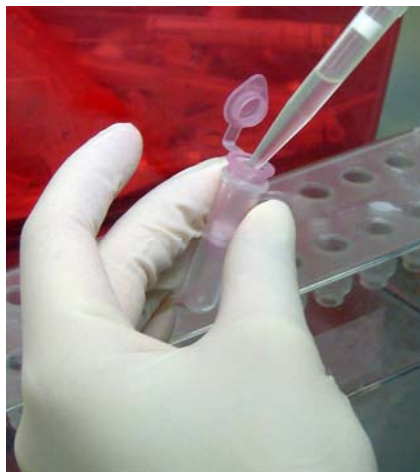
3.2.1 Ročna izolacija

DNA smo iz vzorcev izolirali s pomočjo QIAamp® UltraSens™ Virus Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) kompleta po navodilih proizvajalca.

- Najprej smo odpipetirali 400 µl plazme in 600 µl PBS, predogreta na sobno temperaturo (25°C), v 2 ml mikrocentrifugirko (ni priložena v paketu). Zagotoviti je potrebno, da pokrovček mikrocentrifugirke ni kontaminiran s plazmo, kajti RNaze, ki jih le ta vsebuje bi v kasnejših korakih lahko takoj razgradile nosilno RNA, ki se jo doda v pokrovček.
- V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 0,8 ml pufera AC, v pokrovček pa 5,6 µl nosilne RNA raztopine in 6 µl interne kontrole. AC pufera in nosilne RNA nismo smeli zmešati pred vnosom v vzorec, saj bi to lahko vodilo v različne količine preostale uporabne RNA. Puffer AC inaktivira RNaze v plazmi.

- Nato smo zaprli pokrovček in vsebino mikrocentrifugirke dobro premešali. Najprej smo mikrocentrifugirko trikrat samo obrnili nato pa še 10 sekund vorteksirali. Obračanje mikrocentrifugirk zagotovi popolno raztopitev nosilne RNA v vzorcu.
- Sledila je 10 minutna inkubacija pri sobni temperaturi.
- Vzorec smo nato 3 minute centrifugirali pri 4000 rpm. Ta korak je ključen v postopku izolacije. Po centrifugiranju naj bi bil supernatant povsem bister, usedlina pa naj bi ohranila obliko tudi po tem, ko mikrocentrifugirko obrnemo.
- Supernatant smo nato popolnoma odstranili in zavrgli.
- Da bi razrahljali usedlino, smo prijeli mikrocentrifugirko za pokrovček in nekajkrat pretresli dno s prsti. Paziti je bilo potrebno, da koščki usedline ne ostajajo v pokrovčku.
- Dodali smo 300 μ l na 60°C predogretega pufru AR in pa še 20 μ l proteinaze K. Segrevanje pufru na 60°C olajša raztapljanje usedline in poveča aktivnost proteinaze K.
- Vorteksirali smo toliko časa, dokler ni bila usedlina popolnoma raztopljena. Pomembno je, da se usedlina popolnoma raztopi, saj s tem zagotovimo maksimalno količino izolirane DNA. Pomaga, če vorteksiramo v presledkih, saj tako omogočimo boljšo razgradnjo s strani proteinaze K.
- Nato smo 10 minut inkubirali pri 40°C na stresalniku z nastavljenim maksimalnim stresanjem. To je zadosten čas za delovanje proteinaze K in ga zato nismo smeli prekoračiti.
- Epruveto smo kratek čas centrifugirali, s čimer smo odstranili kapljice iz notranje strani pokrovčka.

- Dodali smo 300 μ l puфра AB, dobro premešali z vorteksom in na kratko centrifugirali, s čimer smo odstranili kapljice iz notranje strani pokrovčka.
- Previdno smo dodali 700 μ l lizata v QIAamp Spin Column (nameščena v 2 ml zbiralni mikrocentrifugirki) ne da bi zmočili stranice le te. Zaprli smo pokrovček in 1 minuto centrifugirali pri 7000 rpm. Centrifugiranje pri višji hitrosti lahko povzroči nezadostno vezavo DNA na silikagelsko membrano, kar vodi v zmanjšan doprinos izolirane DNA.
- QIAamp Spin Column smo nato namestili v novo 2 ml zbiralno mikrocentrifugirko (priložena v kompletu) in zavrgli mikrocentrifugirko, ki je vsebovala filtrat. Previdno smo odprli QIAamp Spin Column in dodali 500 μ l puфра AW1. 1 minuto smo centrifugirali pri 8000 rpm. Centrifugiranje pri višji hitrosti v tem koraku ne vpliva na količino izolirane DNA.

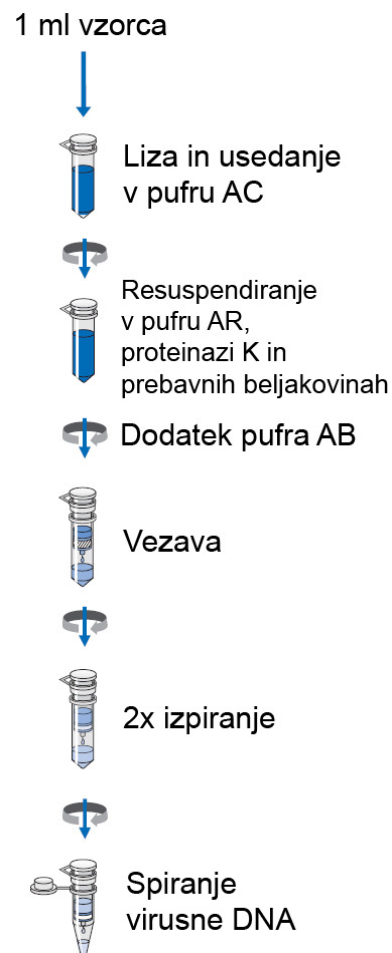


Slika 2: Dodajanje puфра v QIAamp Spin Column.

- QIAamp Spin Column smo zopet namestili v novo 2 ml zbiralno mikrocentrifugirko (priložena v kompletu) in zavrgli mikrocentrifugirko, ki je vsebovala filtrat. Previdno smo odprli QIAamp Spin Column in dodali 500 μ l puфра AW2. Nato smo 3 minute centrifugirali pri 14000 rpm.
- QIAamp Spin Column smo namestili v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko (ni priložena v kompletu) in zavrgli zbiralno mikrocentrifugirko, ki je vsebovala

filtrat. Previdno smo odprli QIAamp Spin Colum. Da bi izprali vezano DNA iz kolone, smo previdno dodali 30 μ l pufru AVE. Nato smo 1 minuto centrifugirali pri 8000 rpm. Za čim boljši izkoristek čiščenja je potrebno s pufrom AVE zmočiti celotno membrano.

- Izpiranje smo ponovili z dodatkom 30 μ l pufru AVE in 1 minutnim centrifugiranjem pri 8000 rpm. Dvakratno izpiranje zagotovi maksimalen izkoristek izolacije DNA.
- Izolirano DNA v mikrocentrifugirki smo ustrezno označili in prepustili nadaljnji obdelavi.



Slika 3: Shematski prikaz poteka ročne izolacije.

3.2.2 Avtomatska izolacija

DNA smo iz vzorcev avtomatsko izolirali s pomočjo EZ-1 Virus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) kompleta na aparatu BioRobot EZ-1 (Qiagen, Hilden, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Pri tej metodi je večina reagentov nameščenih na posebnem traku, katerega moramo samo vstaviti v aparat in nato ta sam meša posamezne reagente, kot je to določeno v protokolu zapisanem na posebni programski kartici (Slika 4).

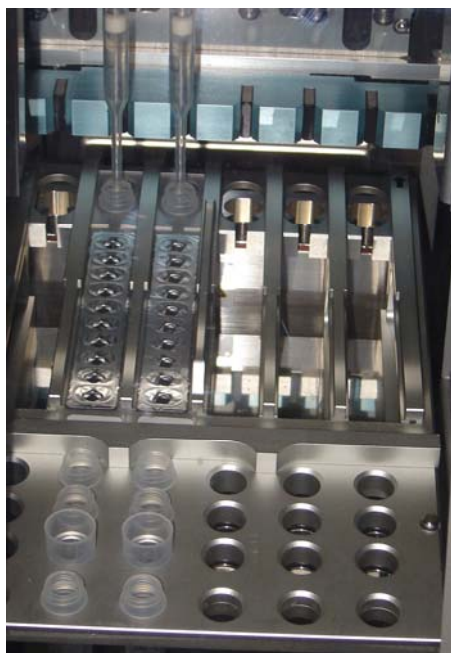


Slika 4: Trak z reagenti, potrebnimi za izolacijo DNA.

- Najprej smo morali za vsak vzorec v 1,5 ml mikrocentrifugirko (priloženo kompletu) pripraviti mešanico, ki je vsebovala 75 μ l proteinaze K, 7 μ l interne kontrole in 3 μ l nosilne RNA. To je bilo potrebno na rahlo premešati in za kratek čas centrifugirati, da se je celotna mešanica zbrala na dnu mikrocentrifugirke.
- V 2 ml mikrocentrifugirko (priloženo kompletu) smo odpipetirali 400 μ l plazme. Če je bil vzorec prej zamrznjen, smo ga morali najprej dobro premešati in šele nato uporabiti.
- Nato smo vstavili EZ1 Virus kartico v aparat BioRobot EZ1. Najprej smo pritisnili START, da se nam je pokazal protokol, po katerem smo nato v aparat zlagali mikrocentrifugirke, kot je bilo zahtevano korak za korakom. Najprej smo izbrali količino plazme, ki smo jo želeli obdelati in pa izhodni volumen izolirane virusne

DNA. Mi smo navadno uporabili 400 μ l plazme (včasih tudi 200 μ l, če je bilo vzorca premalo), izhodni volumen pa je bil 75 μ l.

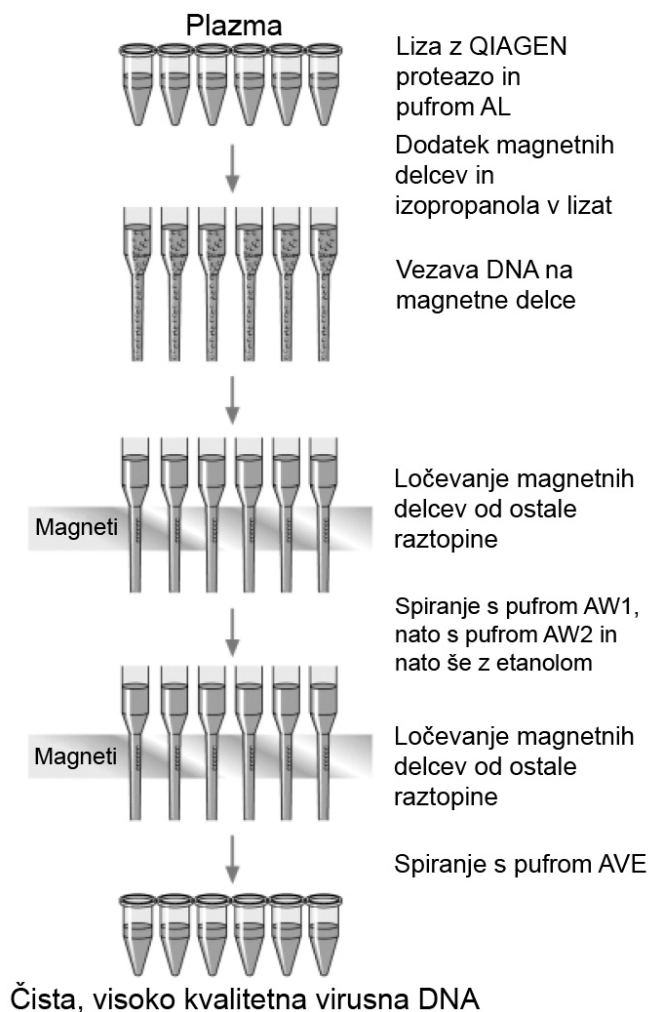
- V posebno stojalo smo vstavili trakove z reagenti in v posebno mesto na traku še eno prazno 1,5 ml mikrocentrifugirko.
- V drugo stojalo pa smo dali na začetek prazno 1,5 ml mikrocentrifugirko za izhodno DNA, nato v naslednjo luknjo tulec in vanj nastavek za pipetiranje (priložena kompletu), nato še eno 1,5 ml mikrocentrifugirko s prej pripravljeno mešanico reagentov in še 2 ml mikrocentrifugirko s plazmo.
- Nato smo zaprli vrata in pritisnili START.



Slika 5: Potek pipetiranja v aparatu BioRobot EZ-1.

- Ko je bil postopek izolacije končan, smo zopet odprli vrata, pokrili zbirne mikrocentrifugirke z izolirano DNA, jih označili in postavili na poseben podstavek z magnetom, ki je zbral morebitne magnetne delce na enem mestu. Ti lahko končajo v izhodnem vzorcu zaradi napake pri končnem spiranju DNA z magnetnih delcev v sami aparaturi.

- Ostale mikrocentrifugirke in trak ter nastavek za pipetiranje in tulec smo zavrgli.
- Stojala smo nato zložili nazaj v aparat, ga ugasnili in izvlekli kartico.



Slika 6: Shematski prikaz poteka avtomatske izolacije.

3.3 KVANTIFIKACIJA IZOLIRANE CMV DNA

3.3.1 Priprava mešanice za RT PCR

V posebne steklene kapilare smo dodali 12,5 μ l mešanice glavnih reagentov potrebnih za RT PCR in pa 2,5 μ l magnezijevega klorida. To mešanico smo si prej pripravili v mikrocentrifugirki, katero smo nato na rahlo pretresli in na kratko centrifugirali, nato pa smo to mešanico razporedili po 15 μ l v kapilare, kamor smo

kasneje dodali še 10 µl izolirane DNA. Za vzorec vode in standarda pa smo morali v zmes glavnih reagentov potrebnih za RT PCR in magnezijevega klorida dodati še interno kontrolo in sicer 1 µl na vzorec, se pravi v našem primeru 2 µl. Ta dva vzorca namreč ne vsebujeta interne kontrole, kot jo vsebujejo vzorci z izolirano DNA, kjer smo interno kontrolo vključili že v samo izolacijo. Tudi to mešanico smo nato razporedili po 15 µl v dve kapilari, kamor smo kasneje dodali še vodo in v drugo kapilarno naš standardni vzorec.

3.3.2 RT PCR

Ko smo dodali še 10 µl izolirane DNA v kapilare smo le te zaprli in namestili v posebno stojalo, katerega smo po centrifugiranju namestili v LightCycler®.

V posebnem programu na računalniku, ki je potreben za delovanje aparata LightCycler®, smo že prej uredili protokol po katerem naprava deluje. Dodali smo še imena vzorcev in pričeli z RT PCR-jem.

Protokol je sestavljen iz začetne aktivacije termostabilne DNA polimeraze, nato sledi 10 ciklov pomnoževanja, kjer se postopno znižuje temperatura delovanja polimeraze, nato pa še 40 ciklov pomnoževanja in hkrati po vsakem končanem ciklu tudi merjenje fluorescence v vzorcu. Na koncu pa je na vrsti še ohlajanje vzorcev.

3.3.3 Določanje koncentracije CMV DNA v vzorcih

Po končani reakciji nam program na podlagi standardnega vzorca, katerega koncentracija je poznana, in umeritvene krivulje, katero smo napravili ko smo prvič izvedli to reakcijo, poda koncentracijo CMV DNA v vzorcih, če je ta tam prisotna. Pri določitvi koncentracije je pomemben predvsem začetek pomnoževanja CMV DNA, ko izmerjena fluorescenca preseže določen prag. Odvisno od tega kdaj se je to zgodilo, v katerem ciklu, nam potem računalnik poda rezultat.

Hkrati aparat meri tudi količino interne kontrole, seveda na drugem meritvenem kanalu. Če se nam je interna kontrola pomnožila, lahko zatrdimo, da je bila

izolacija DNA uspešna in da so dobljeni rezultati pravilni. V nasprotnem primeru pa je potrebno izolacijo ponoviti, oziroma vzorec redčiti, saj se rado zgodi, da je zaradi prisotnosti določenih substanc v vzorcu, PCR reakcija inhibirana in je zato potrebno zmanjšati količino teh inhibitornih substanc.

Lahko pa se tudi zgodi, da se interna kontrola ne pomnoži, vzorec pa vsebuje CMV DNA. To se lahko zgodi zaradi tega, ker so se vsi PCR reaktanti porabili za pomnoževanje CMV DNA, za pomnožitev interne kontrole pa jih je tako zmanjkalo.

Dobljene koncentracije je bilo potrebno na koncu še preračunati na ml začetnega vzorca in sicer po enačbi:

$$\text{kopije DNA /ml vzorca} = \frac{\text{rezultat (kopije /}\mu\text{l)} \times \text{izhodni volumen pri izolaciji (}\mu\text{l)}}{\text{vstopni volumen plazme pri izolaciji (ml)}}$$

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA POZITIVNIH REZULTATOV

Vse pozitivne rezultate smo najprej logaritmirali, saj kliniki pri svojem delu operirajo predvsem z logaritmskimi vrednostmi koncentracij CMV DNA. S tem pa smo dobili tudi enakomernejšo razporeditev vrednosti na grafu, saj smo zmanjšali vpliv zelo visokih in zelo nizkih vrednosti. Te vrednosti smo vstavili v graf, kjer so bili na y osi logaritmi vrednosti pridobljenih z avtomatsko izolacijo, na x osi pa logaritmi vrednosti pridobljenih z ročno izolacijo.

Nato pa smo izračunali še Pearsonov koeficient korelacije za dve enakovredni, povezani spremenljivki in sicer po enačbi:

$$\text{Pearsonov koeficient korelacije} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Ta koeficient ima vrednosti od -1 do +1 in bolj kot se njegova vrednost približuje mejnim vrednostim, bolj sta spremenljivki povezani. Pri 0 so vrednosti na grafu razporejene v obliki kroga, ko pa se od te vrednosti oddaljemo se oblika razporeditve spreminja v elipso, ki je vedno ožja. Pri 1 oziroma -1 pa so vrednosti razporejene v obliki premice in ima tako obliko enorazsežne normalne porazdelitve (Košmelj, 2001).

Na graf smo postavili tudi regresijsko premico, ki je črta, ki se kar najbolje prilega vsem točkam na grafu in njeno enačbo. Ta ima obliko:

$$y = b \times x + a,$$

kjer je b tangens naklonskega kota premice in a odsek na y osi.

Neznanki a in b smo izračunali po naslednjih enačbah:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b \times \bar{x}$$

Izračunali smo tudi povprečje vseh razlik logaritmov. Za mejno vrednost smo postavili vrednost 0,5. Če je povprečje vseh razlik logaritmov večje od 0,5 potem ene metode ne moremo zamenjati z drugo, saj se rezultati preveč razlikujejo med seboj, če pa je povprečje manjše, potem pa to lahko storimo.

4 REZULTATI

Skupno je bilo testiranih 129 vzorcev plazme. Iz 81 vzorcev smo DNA vzporedno izolirali z ročno in avtomatsko izolacijo. 48 vzorcev pa je bilo prej zamrznjenih, saj smo DNA ročno izolirali že pred časom, sedaj pa smo jih odmrznili in DNA izolirali še z avtomatsko metodo. Pregled rezultatov je podan v Preglednici 1.

4.1 VZPOREDNA IZOLACIJA DNA

Kot je razvidno iz Preglednice 1, je bilo 41 (50,6 %) vzorcev negativnih ob uporabi obeh metod izolacije. Pri 26 (32,1 %) vzorcih je bila razlika v logaritmu manjša od 0,50, pri petih (6,2 %) vzorcih plazme pa je bila omenjena razlika večja od 0,50 (Preglednica 3). Pri devetih (11,1 %) vzorcih plazme z uporabo ene (večinoma avtomatska izolacija) od obeh metod nismo dokazali prisotnosti CMV v vzorcu, medtem ko smo jo dokazali z uporabo druge metode (večinoma ročna izolacija) (Preglednica 2). V vseh slednjih vzorcih smo z drugo metodo dokazali manj kot 100 kopij CMV DNA/ml vzorca plazme.

4.2 NEVZPOREDNA IZOLACIJA DNA

Če pregledamo samo rezultate nevzporedne izolacije DNA, ko smo avtomatsko izolacijo izvedli naknadno dobimo sledeče rezultate (Preglednica 1). 10 (20,8 %) vzorcev je bilo negativnih ob uporabi obeh metod izolacije. Pri 23 (47,9 %) vzorcih je bila razlika v logaritmu manjša od 0,50, pri 10 (20,8 %) vzorcih plazme je bila omenjena razlika večja od 0,50 (Preglednica 3). Pri petih (10,4 %) vzorcih plazme z uporabo ene (večinoma avtomatska izolacija) od obeh metod nismo dokazali prisotnosti CMV v vzorcu, medtem ko smo jo dokazali z uporabo druge metode (večinoma ročna izolacija) (Preglednica 2).

4.3 VSI VZORCI

Kot je razvidno iz Preglednice 1, je bilo izmed vseh analiziranih vzorcev, 51 (39,5 %) vzorcev negativnih ob uporabi obeh metod za izolacijo DNA. Pri 49 (38,0 %) vzorcih plazme je bila razlika v logaritmu končnega rezultata manjša od 0,50. Pri 15 (11,6 %) je bila ta razlika večja od 0,50 (Preglednica 3). Pri 14

(10,9 %) vzorcih z uporabo ene (večinoma avtomatska izolacija) od obeh metod za izolacijo DNA nismo dokazali tarčnega zaporedja CMV, medtem ko smo z uporabo druge metode (večinoma ročna izolacija) dokazali prisotnost CMV v vzorcih plazme (Preglednica 2). Pri večini izmed slednjih vzorcev smo z drugo metodo zaznali manj kot 100 kopij CMV DNA/ml vzorca.

Preglednica 1: Primerjava uspešnosti izolacije DNA z uporabo ročne in avtomatske metode (n=129).

	vsi vzorci (n=129)		vzporedna izolacija (n=81)		nevzporedna izolacija (n=48)	
	št. vzorcev	delež	št. vzorcev	delež	št. vzorcev	delež
obe izolaciji -	51	39,5 %	41	50,6 %	10	20,8 %
ročna +, avtomatska -	12	9,3 %	8	9,9 %	4	8,3 %
ročna -, avtomatska +	2	1,6 %	1	1,2 %	1	2,1 %
razlika v log <0,5	49	38,0 %	26	32,1 %	23	47,9 %
razlika v log ≥0,5	15	11,6 %	5	6,2 %	10	20,8 %

Preglednica 2: Logaritmi koncentracij DNA v vzorcih, kjer je bila izolacija DNA z eno metodo izolacije uspešna, z drugo pa ne (n=14).

Št. vzorca	log ročne izolacije	log avtomatske izolacije	vzorec vmes zamrznjen
4352	neg	2,13	da
4548	1,26	neg	da
4639	1,61	neg	da
4943	1,62	neg	da
4977	1,28	neg	da
5700	0,48	neg	ne
6053	1,70	neg	ne
6427	neg	1,58	ne
6429	0,48	neg	ne
6559	1,67	neg	ne
6589	0,00	neg	ne
6758	1,67	neg	ne
6766	1,57	neg	ne
7041	1,18	neg	ne

Preglednica 3: Podatki o vzorcih, kjer je bila razlika v logaritmu koncentracij DNA večja ali enaka 0,5 (n=15).

Št. vzorca	log ročne izolacije	log avtomatske izolacije	razlika v log (ročna/avtomatska)	vzorec vmes zamrznjen
3995	2,05	0,30	1,74	da
4144	4,48	3,90	0,58	da
4301	3,43	2,51	0,92	da
4351	4,43	3,74	0,69	da
4421	3,72	3,15	0,57	da
4633	4,54	3,67	0,87	da
4640	1,94	0,70	1,24	da
4840	3,39	1,94	1,45	da
4948	4,06	3,31	0,75	da
5191	4,08	3,58	0,50	da
5949	2,57	1,18	1,39	ne
6018	2,37	3,45	-1,08	ne
6045	2,33	1,75	0,58	ne
6738	1,89	0,60	1,28	ne
6740	2,96	2,09	0,87	ne

Da bi lahko primerjali kakovost izolacije DNA, kjer je ta bila prisotna, glede na to ali je izolacija z obema metodama potekala vzporedno ali ne, moramo izračunati delež pozitivnih rezultatov, kjer je bila razlika logaritmov večja oziroma manjša od 0,5, glede na vse pozitivne rezultate in zraven ne smemo prištevati negativnih (Preglednica 4). Glede na to je 76,6 % vseh razlik logaritmov manjših od 0,5 in 23,4 % večjih od 0,5. Pri vzporedni izolaciji je 83,9 % rezultatov takih, pri katerih je razlika v logaritmih manjša od 0,5 in le 16,1 % večjih. Pri nevzporedni izolaciji pa je 69,7 % vseh razlik v logaritmih manjših od 0,5 in 30,3 % večjih od te vrednosti.

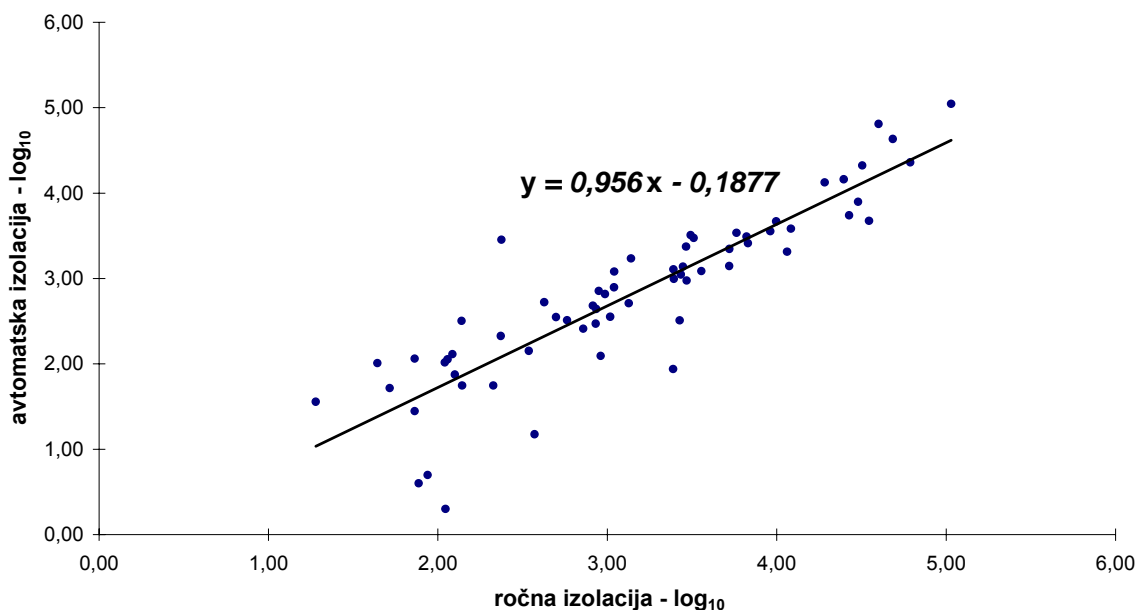
Preglednica 4: Deleži pozitivnih vzorcev, kjer je bila razlika v logaritmu koncentracije DNA večja oziroma manjša od 0,5 (n=64).

	vsi pozitivni vzorci (n=64)		vzporedna izolacija (n=31)		nevzporedna izolacija (n=33)	
	št. vzorcev	delež	št. vzorcev	delež	št. vzorcev	delež
razlika v log <0,5	49	76,6 %	26	83,9 %	23	69,7 %
razlika v log ≥0,5	15	23,4 %	5	16,1 %	10	30,3 %

Najmanjša razlika v logaritmih je bila 0, kar pomeni da sta bili detektirani koncentraciji enaki, največja razlika pa je bila 1,74 ko smo pri ročni izolaciji dobili 111 kopij/ml, pri avtomatski pa 2 kopiji/ml. Povprečje vseh razlik logaritmov znaša 0,33.

Izračunali smo tudi Pearsonov koeficient korelacije, ki znaša 0,89.

Logaritme koncentracij CMV DNA dobljenih z obema izolacijskima metodama smo nato zbrali tudi na razsevnem grafu (Slika 7). V graf smo vstavili tudi regresijsko premico in njeno enačbo.



Slika 7: Primerjava logaritmiranih vrednosti koncentracij CMV DNA pridobljenih z avtomatsko in ročno izolacijo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 PRIMERJAVA DVEH METOD ZA IZOLACIJO VIRUSNE DNA

Povprečje vseh razlik logaritmov je bilo enako 0,33, kar je manj kot 0,5, kjer smo postavili mejo. Zato lahko trdimo, da sta metodi primerljivi. Tudi visoka vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije, ki znaša kar 0,89, to le potrjuje. Če bi bila ta vrednost 1, potem bi bili obe metodi v popolni linearni povezanosti, tako pa so točke vseeno nekoliko razpršene okoli regresijske premice. Iz enačbe regresijske premice pa lahko razberemo, da so pričakovane vrednosti logaritmov rezultatov dobljenih z ročno izolacijo nekoliko višje, kot pa logaritmi rezultatov pridobljenih z avtomatsko izolacijo, saj je koeficient manjši od 1 in prosti člen malce negativen vendar pa so te razlike minimalne.

Večje razlike med obema metodama izolacije v posameznih primerih gre morda pripisati vplivu človeka, saj je le ta pri ročni izolaciji bolj, pri avtomatski izolaciji pa manj udeležen v postopek izolacije. Določen del napake pa je mogoče pripisati tudi slučaju, saj je nemogoče dvakrat odpipetirati začetni volumen vzorca s popolnoma enako sestavo oziroma vsebnostjo virusa, predvsem zaradi neenakomerne razporeditve delcev v mikrocentrifugirki, katero pa rešujemo s predhodnim mešanjem vzorca. Na to razliko pa verjetno vplivajo tudi razlike med postopkoma obeh načinov izolacije.

Ob pogledu na Preglednico 2 bi verjetno pomislili, da je ročna izolacija boljše kot pa avtomatska. Vendar pa temu ni tako, saj so koncentracije virusne DNA v teh izolatih pod mejo 100 kopij CMV DNA na ml vzorca. Tako nizke koncentracije CMV DNA pa klinično sploh niso pomembne. To mejo preseže le en vzorec, ki pa je bil izoliran z avtomatsko metodo.

Dva različna načina priprave vzorcev za izolacijo DNA sta nam omogočila tudi preučitev vpliva zamrzovanja na samo izolacijo. Opazili smo, da je pri tistih vzorcih, kjer sta izolaciji potekali istočasno in tako ni bilo predhodnega zamrzovanja vzorcev, več takih rezultatov, kjer je razlika logaritmov manjša od

0,5, kot pa pri tistih vzorcih, ki so bili pred avtomatsko izolacijo zamrznjeni. Glede na to lahko sklepamo, da predhodno zamrzovanje vzorcev v določeni meri negativno vpliva na samo izolacijo DNA. Kljub vsemu pa ta vpliv ni tolikšen, da bi onemogočil diagnostiko virusa v tako pripravljenih vzorcih, z eno ali z drugo metodo.

5.2 SKLEPI

Pri primerjavi obeh metod izolacije DNA smo ugotovili, da je ročno izolacijo DNA s pomočjo QIAamp® UltraSens™ Virus Kit kompleta mogoče zamenjati z avtomatsko izolacijo DNA s pomočjo EZ-1 Virus Mini Kit kompleta.

Avtomatska izolacija je enostavnejša od ročne, saj zahteva manj fizičnega dela.

Pri avtomatski izolaciji je možnost kontaminacije manjša kot pri ročni.

Rezultati pridobljeni z avtomatsko izolacijo so ponovljivi in bolj primerljivi, kot pa rezultati pridobljeni z ročno izolacijo, saj je pri ročni izolaciji močno prisoten človeški vpliv. Ravno ta vpliv pa je pri avtomatski izolaciji zreduciran na minimum.

6 POVZETEK

Virus človeške citomegalije je najpomembnejši virusni povzročitelj okužb pri imunsko oslabljenih osebah. Poleg tega, da povzroča resne okvare pri novorojenčkih, povzroča širok spekter nepravilnosti tudi pri nekoliko starejših otrocih in odraslih: od asimptomatske, subklinične okužbe, do mononukleoze pri zdravih posameznikih in do raztresene oblike obolenja pri imunsko oslabljenih pacientih.

Za odkrivanje okužb s tem virusom se poleg klasičnih uporabljajo tudi molekularne metode, ki omogočajo detekcijo že zelo majhnih količin virusa, ko le ta sploh še ne povzroča bolezni.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti ali je mogoče v postopku kvantitativnega dokazovanja CMV DNA zamenjati standardno ročno metodo izolacije DNA z avtomatsko.

V raziskavo smo vključili 129 kliničnih vzorcev plazme, ki so bili poslani v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisa in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Ugotovili smo, da je ročno izolacijo CMV DNA mogoče zamenjati z avtomatsko, pri tem pa se dobljeni rezultati razlikujejo v dovoljenih mejah. Prednosti avtomatske izolacije so zmanjšana možnost kontaminacije, večja primerljivost rezultatov, ponovljivost rezultatov in prihranek pri količini vložene delo potrebne za samo izolacijo.

7 VIRI

Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2004. Herpesviruses. V: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 23rd ed. New York, The McGraw-Hill Companies, Inc: 429-452

Hirsch M.S. 2005. Cytomegalovirus and human herpesvirus types 6, 7, and 8. V: Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. Kasper D.L., Braunwald E., Fauci A.S., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. (eds.). New York, The McGraw-Hill Companies, Inc: 1049-1053

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Piiparinen H., Höckerstedt K., Grönhagen-Riska C., Lautenschlager I. 2004. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *Journal of Clinical Virology*, 30: 258-266

Sia I.G., Patel R. 2000. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 1: 83-121

Stöcher M., Hölzl G., Stekel H., Berg J. 2004. Automated detection of five human herpes virus DNAs by a set of LightCycler PCRs complemented with a single multiple internal control. *Journal of Clinical Virology*, 29: 171-178

Zaia J.A. 2002. Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 999-1004

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med. za to, da sem lahko opravljal to diplomsko nalogo v njegovem laboratoriju. Hvala za jasno usmerjanje pri pisanju diplomske naloge.

Hvala Kristini, Matejki, Robiju in Tini za strokovno pomoč in praktične nasvete ter čas, ki mi je bil namenjen.

PRILOGE

Priloga A: Koncentracije DNA izolirane z ročno in avtomatsko metodo izolacije ter razlike logaritmov koncentracij DNA izolirane z obema metodama izolacije.

št. vzorca	ročna izolacija (kopije/ml)	avtomatska izolacija (kopije/ml)	razlika logaritmov (ročna - avtomatska)
Vzorci, ki so bili med eno in drugo metodo izolacije zamrznjeni			
3994	73	115	-0,197
3995	111	2	1,744
4000	neg	neg	
4144	30240	7905	0,583
4145	neg	neg	
4301	2676	323	0,918
4314	neg	neg	
4351	26760	5497	0,687
4352	neg	136	
4421	5244	1398	0,574
4433	892	714	0,097
4434	44	102	-0,365
4468	neg	neg	
4517	2916	2355	0,093
4547	1100	1207	-0,040
4548	18	neg	
4633	35040	4728	0,870
4639	41	neg	
4640	87	5	1,241
4650	126	75	0,225
4672	5256	2223	0,374
4699	neg	neg	
4724	24900	14512	0,234
4742	424	528	-0,095
4743	neg	neg	
4746	neg	neg	
4747	139	56	0,395
4748	39900	64556	-0,209
4840	2445	87	1,450
4930	579	325	0,251
4943	42	neg	
4948	11520	2058	0,748
4954	19200	13320	0,159
4973	969	656	0,169
4977	19	neg	
4990	2460	1278	0,284
4991	5790	3427	0,228
5016	neg	neg	
5070	6765	2591	0,417
5087	3100	3228	-0,018
5100	2472	991	0,397
5117	822	481	0,233

Nadaljevanje Priloga A: Koncentracije DNA izolirane z ročno in avtomatsko metodo izolacije ter razlike logaritmov koncentracij DNA izolirane z obema metodama izolacije.

št. vzorca	ročna izolacija (kopije/ml)	avtomatska izolacija (kopije/ml)	razlika logaritmov (ročna - avtomatska)
5118	neg	neg	
5187	235	212	0,045
5191	12120	3838	0,499
5192	neg	neg	
5303	498	353	0,150
5365	9165	3570	0,410
Vzorci, pri katerih sta bili izolaciji opravljeni sočasno			
5375	138	318	-0,363
5489	73	28	0,416
5490	neg	neg	
5529	860	439	0,292
5565	neg	neg	
5681	neg	neg	
5692	neg	neg	
5696	neg	neg	
5700	3	neg	
5701	neg	neg	
5759	1041	357	0,465
5765	neg	neg	
5768	122	130	-0,028
5804	neg	neg	
5784	neg	neg	
5823	neg	neg	
5824	1096	788	0,143
5838	2721	1112	0,389
5950	neg	neg	
5949	372	15	1,394
5988	neg	neg	
5998	neg	neg	
6016	neg	neg	
6018	237	2848	-1,080
6019	neg	neg	
6101	neg	neg	
6124	neg	neg	
6125	neg	neg	
6045	212,5	56	0,579
6053	50	neg	
6076	neg	neg	
6087	neg	neg	
6144	114	113	0,004
6145	721	258	0,446
6219	neg	neg	
6261	344	142	0,384
6267	neg	neg	
6333	107055	110887	-0,015

Nadaljevanje Priloga A: Koncentracije DNA izolirane z ročno in avtomatsko metodo izolacije ter razlike logaritmov koncentracij DNA izolirane z obema metodama izolacije.

št. vzorca	ročna izolacija (kopije/ml)	avtomatska izolacija (kopije/ml)	razlika logaritmov (ročna - avtomatska)
6334	neg	neg	
6389	52	52	0,000
6403	neg	neg	
6404	9933	4659	0,329
6427	neg	38	
6429	3	neg	
6444	neg	neg	
6500	3237	2979	0,036
6502	neg	neg	
6443	neg	neg	
6559	47	neg	
6584	neg	neg	
6585	19	36	-0,278
6587	854	296	0,460
6588	2938	945	0,493
6589	1	neg	
6596	3595	1221	0,469
6638	2796	1377	0,308
6623	neg	neg	
6699	neg	neg	
6715	1340	513	0,417
6738	77	4	1,284
6739	neg	neg	
6740	914	124	0,868
6742	neg	neg	
6758	47	neg	
6759	61455	22893	0,429
6766	37	neg	
6775	neg	neg	
6776	neg	neg	
6832	neg	neg	
6833	neg	neg	
6845	neg	neg	
6920	1380	1719	-0,095
6921	48405	42975	0,052
6952	neg	neg	
6959	neg	neg	
6960	neg	neg	
6986	31980	21037	0,182
7021	neg	neg	
7041	15	neg	
7050	110	104	0,024
7051	6646	3092	0,332