

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara BREZNIK

**PRIMERJAVA REZULTATOV KVANTITATIVNEGA PCR ZA VIRUS HERPES
SIMPLEKS IN VIRUS EPSTEIN – BARR Z REAGENTI RAZLIČNIH
PROIZVAJALCEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE COMPARISON OF THE RESULTS ACQUIRED BY THE REAL-TIME PCR
FOR DETECTION OF HSV AND EBV DNA WITH REAGENTS OF DIFFERENT
MANUFACTURES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v Laboratoriju za diagnostiko herpesvirusov in respiratornih virusov.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Jožico Marin, univ. dipl. biolog, za somentorico dr. Minko Kovač, univ. dipl. kemik, za recenzentko doc. dr. Evo Ružić-Sabljić, dr. med.

Mentorica: izr. prof. dr. Jožica Marin

Somentorica: dr. Minka Kovač

Recenzentka: doc. dr. Eva Ružić-Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologija

Članica: prof. dr. Jožica MARIN

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

Članica: dr. Minka Kovač

Omega d.o.o.

Članica: doc. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Breznik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7 + 616-071: 577.2.083 (043) =863
- KG virusi/herpesvirusi/herpes simpleks virus/Epstein-Barr virus/diagnostične metode/kvantitativni PCR/diagnostični komplet Artus/diagnostični komplet Roche/diagnostični komplet Argene
- AV BREZNIK, Barbara
- SA MARIN, Jožica (mentorica)/KOVAČ, Minka (somentorica)/RUŽIĆ SABLJIĆ, Eva (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2006
- IN PRIMERJAVA REZULTATOV KVANTITATIVNEGA PCR ZA VIRUS HERPES SIMPLEKS IN VIRUS EPSTEIN-BARR Z REAGENTI RAZLIČNIH PROIZVAJALCEV
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 63 str., 15 pregl., 19 sl., 39 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Na tržišču je mnogo diagnostičnih kompletov različnih proizvajalcev. V naši raziskavi smo preizkusili diagnostične komplete za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo treh proizvajalcev za dokaz DNA virusov herpes simpleks in Epstein-Barr. Za pomnoževanje DNA smo uporabili aparaturo LightCycler 2.0 Roche. Ovrednotili smo naslednje karakteristike testov: občutljivost in specifičnost ter možnost lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov. Rezultate smo ovrednotili glede na rezultate preiskanih vzorcev iz zunanje evropske kontrole. DNA virusa herpes simpleks smo določali v likvorjih bolnikov s sumom na herpesni encefalitis.

Vse vzorce smo preiskali z dvema kompletoma reagentov in ugotovili razlike v občutljivosti. Lažno pozitivnih rezultatov nismo dobili z nobenim testom. DNA virusa Epstein-Barr smo s tremi različnimi kompleti diagnostičnih reagentov določali v plazmi, serumu, kostnem mozgu, polimorfonuklearnih celicah in brisu žrela. Določili smo, kateri test ima največjo občutljivost in za katero vrsto kužnin je najprimernejši. Lažno pozitivnih rezultatov nismo dobili. V raziskavi smo pri določanju DNA obeh virusov z različnimi diagnostičnimi reagenti dobili malo rezultatov, ki so bili povsem primerljivi. Večja občutljivost posameznega testa še ne pomeni nujno, da je test boljši-manjše število določenih kopij genoma lahko pomeni lažno pozitiven rezultat, ki klinično ni pomemben. Zato bo s časom šele jasno, kateri test je v določenem primeru najboljši.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 578.7 + 616-071: 577.2.083 (043) =863
CX viruses/herpesviruses/herpes simplex virus/Epstein-Barr virus/diagnostic methods/real-time PCR/diagnostic kit Artus/diagnostic kit Roche/diagnostic kit Argene
AU BREZNIK, Barbara
AA MARIN, Jožica (supervisor)/KOVAČ, Minka (co-advisor)/RUŽIĆ SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI THE COMPARISON OF THE RESULTS ACQUIRED BY THE REAL-TIME PCR FOR DETECTION OF HSV AND EBV DNA WITH REAGENTS OF DIFFERENT MANUFACTURES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 63 p., 15 tab., 19 fig., 39 ref.
LA sl
AL sl/en
AB On the market we can find diagnostic kits of various manufacturers. In our research we tested diagnostic kits of three manufacturers for the diagnostics of the Virus Herpes Simplex and Epstein-Barr Virus. For DNA amplification we used the RocheLight Cycler instrument. We have evaluated the following characteristics of the tests: sensitivity and

specificity, and the possibility of the falsely negative and the falsely positive results. The results were given value according to the results of outer European control. DNA of the Virus Herpes Simplex was determined in the cerebrospinal fluid of the patients with a suspicion on the herpetic encephalitis. All samples were tested with two diagnostic kits and determined the differences in sensitivity. None of the tried tests provided the falsely positive results. DNA of the Epstein-Barr Virus was determined in the plasma, serum, bone medulla, polimorphonuclear cells and the throat smear. We determined, which test has the best sensitivity and for which sample it is the most appropriate. The falsely positive results were not acquired. In the research determining DNA of both viruses with different diagnostic kits, we acquired few results that were completely comparable. Greater sensitivity of a particular diagnostic kit does not necessarily mean that the kit is better – smaller number of particular copies of the genom can mean that we are dealing with a falsely positive result, which is clinically unimportant. Therefore, with time it will become clearer which kit is in a certain case better than all others.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	
KEY WORDS DOCUMENTATION	
KAZALO VSEBINE	
KAZALO PREGLEDNIC	
KAZALO SLIK	
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LASTNOSTI HERPESVIRUSOV	3
2.1.1 Zgradba herpesvirusov	3
2.1.2 Razmnoževanje herpesvirusov	3
2.2 VIRUS HERPES SIMPLEKS	4
2.2.1 Vrste okužb in patogeneza virusa herpesa simpleksa	6
2.2.1.1 Patogeneza pri bolnikih z oslabljenim imunskim odzivom	7

2.2.2	Klinična slika okužbe z virusom herpesa simpleksa	7
2.2.2.1	Okužba ust, žrela in ušes	8
2.2.2.2	Okužba spolovil	8
2.2.2.3	Okužba očesa	8
2.2.2.4	Neonatalni herpes	9
2.2.2.5	Encefalitis	9
2.2.2.6	Meningitis	10
2.2.2.7	Herpesni dermatitis in zanohtni prisad	10
2.2.2.8	Okužbe z virusom herpesa simpleksa pri ljudeh z oslabiljenim imunskim odzivom	11
2.2.3	Diagnostika okužb z virusom herpesa simpleksa	12
2.2.3.1	Histopatološki preparati in svetlobna mikroskopija	12
2.2.3.2	Elektronska mikroskopija	12
2.2.3.3	Kultivacija virusa na celični kulturi	12
2.2.3.4	Dokazovanje virusnega antigena	13
2.2.3.4.1	Encimskoimunska metoda	13
2.2.3.4.2	Imunofluorescenca	13
2.2.3.5	Dokazovanje nukleinskih kislin	14
2.2.4	Epidemiologija virusa herpesa simpleksa	15
2.2.4.1	Virus herpes simpleks 1 (HSV 1)	15
2.2.4.2	Virus herpes simpleks 2 (HSV 2)	15
2.3	VIRUS EPSTEIN-BARR	16
2.3.1	Vrste okužb in patogeneza virusa Epstein-Barr (EBV)	17
2.3.2	Proteini EBV	17
2.3.2.1	Latentni proteini	17
2.3.2.2	Latentni membranski proteini	18
2.3.2.3	Vzpostavitev nesmrtnosti celic	18
2.3.3	Klinična slika okužbe z virusom Epstein-Barr	20
2.3.3.1	Infekcijska mononukleoza	20
2.3.3.2	Burkittov limfom	20
2.3.3.3	Rak nosnega žrela (nazofaringealni karcinom)	20
2.3.3.4	Limfoproliferativni sindrom	21
2.3.3.5	Okužba z virusom EBV pri bolnikih z zmanjšanim imunskim odzivom	21
2.3.3.5.1	Okužba z virusom EBV pri bolnikih po presaditvi organov in krvnih celic	21
2.3.3.5.2	Oralna lasasta levkoplakija	22

2.3.3.6	Od okužbe do bolezni	22
2.3.4	Diagnostika okužb z virusom Epstein-Barr	23
2.3.5	Epidemiologija virusa Epstein-Barr	25
2.4	MOŽNOSTI IN RAZVOJ DIAGNOSTIKE OKUŽB S HSV 1, HSV 2 IN EBV	25
2.5	KEMIZEM METODE PCR V REALNEM ČASU	27
2.5.1	Princip delovanja instrumenta LightCycler	27
2.5.2	Virusa herpesa simpleksa 1 in 2 ter PCR v realnem času na instrumentu LightCycler	27
2.5.2.1	Mehanizem detekcije PCR pridelka s hibridizacijskimi sondami	27
2.5.2.2	Ločevanje med HSV 1 in HSV 2	28
2.5.2.3	Kontrola navzočnosti inhibitorjev	28
2.5.2.4	Pomen pozitivne in negativne kontrole	29
2.5.3	Virus Epstein-Barr	30
2.5.3.1	Mehanizem detekcije pridelka s TagMan sondami	30
2.5.3.2	Izdelava standardne krivulje za kvantifikacijo DNA EBV	30
2.5.3.3	Kontrola navzočnosti inhibitorjev	31
2.5.3.4	Pomen pozitivne, negativne in inhibitorne kontrole	31
2.6	POMEN PCR ZA DIAGNOSTIKO OKUŽB S HERPESVIRUSI	32
2.6.1	Herpes simpleks in okužba centralnega živčnega sistema	32
2.6.1.1	Herpesni encefalitis	32
2.6.1.2	Herpesni meningitis	33
2.6.2	Virus Epstein-Barr	33
3	MATERIAL IN METODE DELA	35
3.1	DOLOČANJE DNA VIRUSOV HERPES SIMPLEKSA 1 IN 2	35
3.1.1	Vzorci	35
3.1.2	Komora za pripravo reakcijske mešanice	35
3.1.3	Komora za dodajanje DNA	35
3.1.4	Aparatura za izvedbo PCR v realnem času	35
3.1.5	Pipete	36
3.1.6	Diagnostični komplet za določitev DNA HSV 1/2 (Roche, Nemčija)	36
	sestava	
3.1.7	Priprava reakcijske mešanice za kvantitativni PCR	37
3.1.8	Pogoji PCR	37
3.1.9	Izdelava standardne krivulje	38
3.1.10	Analiza rezultatov	38

3.1.11	Predstavitev rezultatov	38
3.2	VIRUS EPSTEIN-BARR	39
3.2.1	Vzorci	39
3.2.2	Diagnostični komplet za določitev DNA virusa Epstein-Barr (Argene, Francija) sestava	39
3.2.3	Priprava reakcijske mešanice za kvantitativni PCR	40
3.2.4	Pogoji PCR	40
3.2.5	Izdelava standardne krivulje	41
3.2.6	Analiza rezultatov	41
4	REZULTATI	42
4.1	VIRUS HERPES SIMPLEKS 1 IN 2	42
4.1.1	Primerjava rezultatov zunanje evropske kontrole in rezultatov, dobljenih s kompletoma Artus in Roche	42
4.1.2	Primerjava rezultatov testiranj likvorjev dobljenih z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche	44
4.2	VIRUS EPSTEIN-BARR	46
4.2.1	Primerjava rezultatov testiranja vzorcev zunanje evropske kontrole in rezultatov testiranja istih vzorcev, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	46
4.2.2	Primerjava rezultatov določanja koncentracij DNA EBV v kliničnem materialu, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	48
4.2.3	Primerjava rezultatov ugotavljanja števila kopij genoma EBV na mililiter vzorca glede na vrsto kliničnega materiala, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	49
4.2.3.1	Primerjava rezultatov koncentracij DNA EBV v serumu	49
4.2.3.2	Primerjava rezultatov koncentracij DNA EBV v polimorfonuklearnih celicah	50
4.2.3.3	Primerjava rezultatov koncentracij DNA EBV v plazmi	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.1.1	Primerjava rezultatov preiskav vzorcev na DNA virusov herpesa simpleksa 1 in 2	52
5.1.2	Primerjava rezultatov preiskave vzorcev na DNA EBV	53
5.2	SKLEPI	56
6	POVZETEK	58

7	VIRI	60
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Posamezne virusne beljakovine pri boleznih, s katerimi je povezan EBV (Crawford, 2004: 126)	18
Pregl. 2: Serološki profil okužbe z virusom EBV (Murray in sod., 2002a: 492)	24
Pregl. 3: Primerjava pozitivnih rezultatov, dobljenih s tremi metodami v diagnostiki okužb s HSV 1 in HSV 2 (Schmutzhard in sod., 2002: 120)	26
Pregl. 4: Primerjava občutljivosti in specifičnosti testa za diagnostiko okužb s	26

	HSV 1 in HSV 2 z metodo kultivacije virusa in PCR v realnem času (Doornum in sod., 2002: 579-9)	
Pregl. 5:	Povezava okužbe z EBV s presaditvijo organov ali krvnih celic (Niesters in sod., 2000: 714)	34
Pregl. 6:	Diagnostični komplet za kvalitativni PCR za virus HSV 1 in HSV 2 (Roche) (Kit for detection..., 2003: 3)	36
Pregl. 7:	Pogoji PCR (Kit for detection..., 2003: 12-3)	37
Pregl. 8:	Diagnostični komplet za določitev DNA virusa EBV (Argene) (EBV R- gene TM ..., 2005: 3)	39
Pregl. 9:	Pogoji kvantitativnega PCR za dokaz DNA EBV (EBV R-gene TM ..., 2005: 14)	41
Pregl. 10:	Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole 2003 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljenih z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche	42
Pregl. 11:	Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole 2004 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljenih z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche	43
Pregl. 12:	Rezultati testiranja likvorjev, dobljeni z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche	44
Pregl. 13:	Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole iz leta 2003 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	46
Pregl. 14:	Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole iz leta 2005 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	47
Pregl. 15:	Rezultati PCR prikazani kot koncentracije DNA EBV na mililiter v kliničnem materialu, dobljenimi z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	48

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Model herpesvirusa (Drinovec, 2002: 5)	5
Sl. 2: Herpesni zanohtni prisad (Murray in sod., 2002a: 482)	11
Sl. 3: Shema encimsko imunske metode za dokazovanje virusnega	13

	antigena (Marin, 2002: 116)	
Sl. 4:	Neposredna in posredna imunofluorescenca (Marin, 2002: 117)	14
Sl. 5:	Shematski prikaz časovne ekspresije genov EBV in spremljajoči dogodki v celici po infekciji (Crawford, 2004: 129)	19
Sl. 6:	Napredovanje okužbe z virusom EBV (Murray in sod., 2002a: 133)	23
Sl. 7:	Časovna dinamika nastanka protiteles pri okužbi z EBV (Crawford, 2004: 133)	24
Sl. 8:	Shema zaznavanja PCR pridelka in pomnoževane interne kontrole (Kit for detection..., 2003: 5)	29
Sl. 9:	Shema delovanja TaqMan sond za detekcijo PCR pridelka (Premier Biosoft International, 2005)	30
Sl. 10:	Primer izrisane standardne krivulje, izdelane s standardi (LightCycler 2.0 Instrument..., 2003: 96)	31
Sl. 11:	Aparatura LightCycler 2.0 (LightCycler 2.0 Instrument..., 2003: 98)	35
Sl. 12:	Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma HSV na mililiter vzorca zunanje evropske kontrole 2003 in rezultati testiranj istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnim kompletom Artus in Roche	43
Sl. 13:	Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma HSV na mililiter vzorca zunanje evropske kontrole 2004 in rezultati testiranj istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche	44
Sl. 14:	Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma HSV na mililiter likvorja, dobljenih z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche	45
Sl. 15:	Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma EBV na mililiter vzorca zunanje evropske kontrole iz leta 2003 in 2005 ter rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	47
Sl. 16:	Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma EBV na mililiter vzorca kliničnega materiala, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene	49
Sl. 17:	Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma EBV na mililiter seruma, dobljeni z diagnostičnimi	50

kompleti Artus, Roche in Argene

- Sl. 18: Grafični prikaz logaritamskih vrednosti koncentracij v kopijah 50
genoma EBV na mililiter polimorfonuklearnih celic, dobljeni z
diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene
- Sl. 19: Grafični prikaz logaritamskih vrednosti koncentracij v kopijah 51
genoma EBV na mililiter plazme, dobljeni z diagnostičnimi
kompleti Artus, Roche in Argene

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxiribonuclear acid)
dNTP	deoksirobonukleotid trifosfat
EA	zgodnji virusni antigen (angl. early antigen)
EA (D)	zgodnji virusni antigen - difuzna komponenta
EBER	ribonukleinska kislina virusa Epstein-Barr (angl. Epstein-Barr-encoded RNA)
EBNA	jedrni antigeni virusa Epstein-Barr (angl. Ešstein-Barr nuclear antigen)
EBNA-LP	jedrni antigeni virusa Epstein-Barr- vodilni protein (angl. leading protein)
EBV	virus Epstein-Barr
ELISA	encimsko-immunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
HA	heterofilna protitelesa (angl. heterophile antibodies)
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
HSV	virus herpes simpleks
IgG	imunoglobulin G
IM	infekcijska mononukleoza
LATs	z latenco povezani prepisi (angl. latency-associated transcripts)
LMP	latentni membranski protein
LP	latentni protein
MA	membranski antigen
n-PCR	nested-PCR
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polimerase chain reaction)
PMNC	polimorfonuklearna celica
RFLP	profil dolžine restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphisem)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonuclear acid)
VCA	virusni kapsidni protein (angl. viral capsid protein)
VZV	virus varicella zoster
ZEBRA	protein kodiran na regiji Z genoma

1 UVOD

Molekularne metode igrajo zelo pomembno vlogo v diagnostiki mnogih infekcijskih bolezni. Njihov nenehen napredek in razvoj pomeni v virološki diagnostiki pravo revolucijo (Domati-Saad in Scheuermann, 2006). Kar zadeva diagnostiko herpesvirusov, lahko brez dvoma trdimo, da devetdeseta leta 20. stoletja predstavljajo mejo, ko so molekularne tehnike vstopile v redno diagnostično delo (Marin in Klemenc, 2005). Metode temeljijo predvsem na dokazovanju nukleinskih kislin, tako s kvalitativnimi kot s kvantitativnimi možnostmi. Napredek v tehnologiji omogoča standardizirano osamitev DNA in pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Rezultati so hitri in zanesljivi; z uporabo zaprtih sistemov, kot je aparaturna LightCycler, se močno zmanjša možnost kontaminacije (Niesters, 2002).

Virusa herpes simpleks (HSV) in virus Epstein – Barr (EBV) sta zelo razširjena. HSV povzroča po vsem svetu različne klinične slike, predvsem infekcije kože in sluznic, infekcije centralnega živčnega sistema, pri diseminaciji celo infekcije notranjih organov, pri novorojenčkih lahko pride do neonatalne infekcije. Virus herpes simpleks 2 v porodnem kanalu predstavlja za novorojenčka veliko nevarnost. Takšnim infekcijam pripisujejo visoko zbolewnost in smrtnost (Alter, 2005).

Z EBV je inficiranega več kot 95 % svetovnega prebivalstva. Najpogostejši izid primarne infekcije z EBV je akutna infekcijska mononukleoza, katere klasični simptomi so boleče grlo, povišana telesna temperatura in povečane bezgavke. EBV je tudi prvi virus, ki so ga povezali z nastankom malignih tumorjev pri ljudeh, kot je karcinom nosnega žrela in Burkittov limfom. Povzroča tudi limfoproliferativne bolezni v stanjih imunske pomanjkljivosti (Winnie, 2005).

Vse omenjene okužbe so pomembne pri imunsko kompetentnih osebah, vendar predstavljajo veliko večjo nevarnost pri bolnikih z zmanjšano imunsko sposobnostjo. Herpesvirusi namreč po primarni infekciji vzpostavijo latentno stanje, ki ga normalno delujoč imunski sistem uspešno nadzoruje. Kadar pa je imunski sistem človeka oslavljen, se virusi lahko reaktivirajo, pri čemer se sproščajo novi infektivni virusi, ki za okolico predstavljajo vir okužbe (Marin in Klemenc, 2005).

Molekularne metode določanja virusnih nukleinskih kislin so hitre in zanesljive in so v zadnjem času postale nepogrešljive. Omogočajo tudi kvantifikacijo virusne DNA ali RNA v kliničnem vzorcu. Molekularne diagnostične metode se navadno uporabljajo v kombinaciji s klasičnimi. To je pri herpesnem encefalitisu in meningitisu, ko ugotavljamo virusno breme, pri spremljanju uspešnosti protivirusne terapije ter pri ugotavljanju odpornosti genotipov herpesvirusov na protiherpesvirusne učinkovine (Marin in Klemenc, 2005).

Seveda takšen napredek in vse širša uporaba molekularnih metod v vsakdanjem delu diagnostičnih laboratorijev pomeni tudi za proizvajalce reagentov, ki se pri teh molekularnih tehnikah uporabljajo, velik izziv. Težijo k uporabniku čim bolj prijaznim in učinkovitim proizvodom. Tako se na tržišču ustvari konkurenca.

Lahko pa z zagotovostjo trdimo, da do popolne zamenjave klasičnih tehnik z molekularnimi ne bo prišlo (Niesters, 2002).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen diplomske naloge je bil preiskati vzorce na navzočnost DNA virusov herpes simpleks in Epstein-Barr z metodo kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času na sistemu LightCycler z reagenti dveh oziroma treh različnih proizvajalcev ter dobljene rezultate ovrednotiti s primerjavo.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakujemo primerljive rezultate med dvema diagnostičnima kompletoma v primeru virusa herpes simpleks in tremi diagnostičnimi kompleti v primeru virusa Epstein-Barr.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LASTNOSTI HERPESVIRUSOV

2.1.1 Zgradba herpesvirusov

Človeški herpesvirusi so pomembna skupina DNA virusov, ki imajo enako morfologijo, način razmnoževanja ter sposobnost, da po primarni okužbi preidejo v latentno stanje. Spadajo med večje viruse (povprečno 150 nm), ki imajo ovojnico, v ikozaedrični kapsidi iz 162 kapsomer pa linearno dvojnovijačno DNA. Ovojnica je iz lipidnega dvosloja, v katerega so vstavljeni glikoproteini, ki so pomembni za pritrditev virusa, njegovo fuzijo s celico ter pri izmikanju virusa imunskemu sistemu. Prostor med kapsido in ovojnico se imenuje tegument. V njem so virusni proteini in encimi, potrebni pri replikaciji. Zaradi ovojnice virus uniči kislina, detergenti in izsuševanje (Murray in sod., 2002a).

Infekcije s herpesvirusi so pogoste, virusi so zelo razširjeni. Pred pojavom simptomov po okužbi človeško telo ščiti celični imunski sistem in okužbe navadno niso nevarne, a prav zaradi tega so herpesvirusi zelo nevarni za ljudi z oslabljenim imunskim sistemom, kot so bolniki po presaditvi organov in krvnih celic (Murray in sod., 2002a).

2.1.2 Razmnoževanje herpesvirusov

Virusno razmnoževanje se začne z interakcijo med virusnimi glikoproteini in celičnimi površinskimi receptorji. S fuzijo virusne ovojnice in celične membrane se nukleokapsida sprosti v citoplazmo. Po stiku nukleokapside z jedrno membrano se genom prenese v jedro, kjer se tudi prepíše in podvaja (Murray in sod., 2002a).

Transkripcija genov ter nadaljnja sinteza virusnih proteinov se z regulacijo vrši v treh stopnjah in glede na to lahko virusne proteine razvrstimo v tri skupine:

- Takojšnji zgodnji proteini oziroma α proteini: to so proteini, ki se vežejo na DNA in so pomembni pri regulaciji transkripcije.
- Zgodnji proteini oziroma β proteini: so transkripcijski faktorji in encimi. Med njimi je tudi DNA polimeraza.
- Pozni proteini oziroma γ proteini: strukturnih proteinov ter regulacijski proteini, ki prekinejo sintezo zgodnjih proteinov. Njihova sinteza se vrši šele po začetku podvojevanja virusnega genoma, saj prej niso potrebni.

Prepis virusne DNA v RNA omogoči celična od DNA odvisna RNA polimeraza, replikacijo pa virusna DNA polimeraza. Od tega, kateri geni se prepíšejo, je odvisno, katero vrsto okužbe virus povzroči. Okužba je lahko litična, trajna oziroma perzistentna ali latentna (Murray in sod., 2002a).

Po sintezi strukturnih proteinov se sestavi virusna kapsida, ki v naslednjem koraku zaobjame virusno DNA (Murray in sod., 2002a). Vstop virusnega genoma v kapsido omogoča posebna beljakovina, ki se pritrdi na virusno DNA. Mehanizmi, ki uravnavajo sestavljanje virionov, v večini niso znani. Predpostavljajo pa, da sodelujejo pri izgradnji kapside določene virusno ali celično kodirane beljakovine, ki imajo vlogo tako imenovanih gradbenih odrov (Koren in Marin, 2002).

Ovojnico si virus pridobi z brstenjem skozi jedrno membrano ali membrano Golgijevega aparata. Do celične površine oziroma do celične membrane potuje virus v mešičku endoplazemskega retikuluma. Iz celice izstopi z eksocitozo ali tako, da celica lizira, pri tem pa se virioni sprostijo v okolico (Koren in Marin, 2002).

2.2 VIRUS HERPES SIMPLEKS

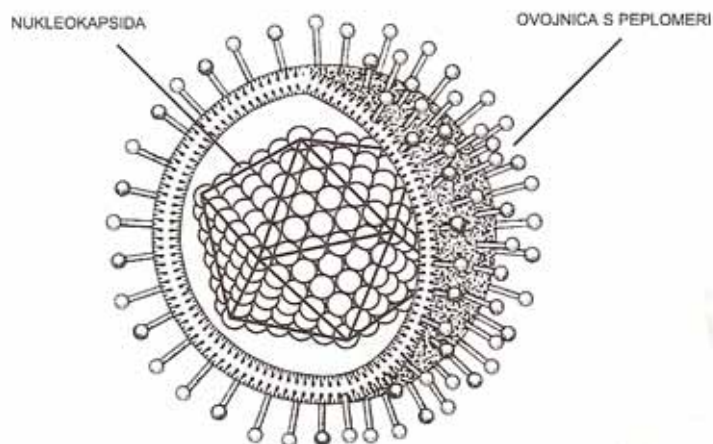
Človeški virus herpes simpleks 1 (HSV 1) in človeški virus herpes simpleks 2 (HSV 2) sta člana družine *Herpesviridae*, poddružine *Alphaherpesvirinae* in rodu *Simplexvirus*. Človek je njun edini naravni gostitelj, vendar je mogoče v laboratorijskih pogojih okužiti tudi druge primare (Cleator in Klapper, 2004).

Oba virusa lahko po prvem stiku povzročita asimptomatsko okužbo. Če se pojavijo simptomi, so lahko blagi ali zelo resni. Primarna tarča obeh virusov so mukoepitelijske celice. Virus se prenaša s tesnim stikom, za HSV 2 je značilno, da se pogosto prenaša s spolnim odnosom. Po infekciji virus vzpostavi latentno stanje v jedru živčnih celic lokalnega dorzalnega ganglija. V določenih intervalih, ki so odvisni od gostitelja, se virus reaktivira in takrat ponovno povzroči klinično sliko. Prva okužba in tudi reaktivacija sta lahko pri imunsko oslabljenih ljudeh zelo nevarni, lahko celo ogrožata življenje (Cleator in Klapper, 2004).

Morfologija virusa herpes simpleks je podobna drugim herpesvirusom. Znotraj kapside je dvojnovijska linearna DNA, ki je v kapsido pritrdjena s številnimi beljakovinskimi vlakni, ki izhajajo iz notranje strani kapside. Kapsida je ikozaedrične oblike iz 162 kapsomer; 12 pentamerov ali pentonov je na ogliščih, 150 heksamerov oziroma heksonov pa je na ploskvah ikozaedra (Cleator in Klapper, 2004). Zdi se, da je ikozaeder za virus najprimernejše geometrijsko telo, saj je fizikalno stabilno in pri povezovanju v kristale med ikozaedri ne ostane veliko vmesnega prostora, kakor bi pri krogli, ki je sicer

stabilnejša (Drinovec, 2002). Notranjost kapside je dostopna preko posebnih transkapsidnih kanalov, ki jih tvorijo pentoni in heksoni, ki so organizirani tako, da tvorijo luknjo. Ti kanali so pomembni pri prehodu virusne DNA in gradbenih proteinov skozi kapsido (Cleator in Klapper, 2004).

Model herpesvirusa prikazuje slika 1.



Slika 1: Model herpesvirusa (Drinovec, 2002: 5)

Med kapsido in ovojnico je tegument, ki vsebuje vsaj 12 proteinov, ki imajo pomembno vlogo v zgodnjih stopnjah virusnega razmnoževanja, ki sledi po penetraciji virusa v gostiteljsko celico. Ovojnico virus pridobi po prehodu skozi jedrno membrano. Tako ovojnico virus modificira z vgradnjo lastnih glikoproteinskih izrastkov (Cleator in Klapper, 2004). Genom virusa herpesa simpleksa kodira vsaj 11 različnih glikoproteinov. Njihove vloge so različne:

- ✚ pri vezavi na površino gostiteljske celice (gB, gC, gD in gH)
- ✚ pri zlitju virusne ovojnice z membrano gostiteljske celice (gB)
- ✚ pri izgradnji virusa - strukturni proteini
- ✚ pri pobegu oziroma izmikljanju imunskemu sistemu (gC, gE in gI)

Na primer, če se virusni protein gC veže na komponento C3 komplementnega sistema, ki je pomemben pri imunski obrambi, se le-ta izloči iz seruma, kar pomeni, da se virus na tak način izogne obrambi (Murray in sod., 2002a).

2.2.1 Vrste okužb in patogeneza virusa herpesa simpleksa

Primarna okužba z virusom herpesa simpleksa 1 ali 2 pomeni prvo srečanje dovzetnega gostitelja z virusom. Po primarni okužbi vzpostavi virus latentno stanje v lokalnem gangliju. Reaktivacija virusa nastopi ob motnji gostiteljevega imunskega sistema, kar se izraža s ponovno klinično sliko na mestu primarne okužbe. Če se posameznik ponovno okuži z enakim virusom, le na drugem mestu, okužbo pa si je prenesel sam, imenujemo to endogena reinfekcija. V primeru reinfekcije, pri čemer pa je vir virusa okolje in ne že okužen posameznik, imenujemo to eksogena reinfekcija (Cleator in Klapper, 2004).

Mehanizem patogeneze je pri virusih HSV 1 in HSV 2 zelo podoben. Oba inficirata in se kasneje razmnožujeta v celicah kože in/ali sluznice ter nato vzpostavita latentno stanje v nevronu; za HSV-1 je to običajno ganglij trivejnega živca, za HSV-2 pa sakralni ganglij. Na ta način se skrivata pred imunskim sistemom (Murray in sod., 2002a). Virus vstopa v živčne celice preko posebnih receptorjev. Pred vstopom v jedro se virusna kapsida odstrani in virusna DNA vstopi v jedro živčne celice, kjer se virusna DNA zaokroži in domnevno obstaja kot izvenkromosomska DNA, se torej ne integrira v celični genom (Cleator in Klapper, 2004).

V času latence je izražanje virusnih genov močno omejeno, tako tudi ne pride do citopatskih učinkov, prav tako pa ni izražen nobeden od virusnih antigenov, ki bi jih gostiteljev imunski sistem lahko prepoznal. Tako okužene celice, v katerih virus vzdržuje latentno stanje, ne vsebujejo nobenih virusnih proteinov, kljub temu pa vsebujejo virusno specifične RNA, ki so prepisane z virusne DNA. To so tako imenovani z latenco povezani prepisi (ang. Latency-associated transcripts oziroma LATs). Kljub temu pa so ugotovili, da v latentnem stanju prihaja tudi do pomnoževanja virusne DNA, vendar v zelo omejenem številu kopij. Domnevajo, da to virusu omogoča reaktivacijo. Med latentnim stanjem pa je za reaktivacijo prav tako zelo pomemben intron LAT na virusnem genomu, saj so dokazali, da so mutante v LAT intronu imele zmanjšano zmožnost reaktivacije. LAT intron ima funkcijo negativne regulacije genov, ki povzročijo lizo celice, omogoči reaktivacijo, obstoj virusa v latentnem obdobju ter ščiti nevrone pred apoptozo (Cleator in Klapper, 2004).

Latentno stanje je odraz visoke uspešnosti virusa, saj omogoča vztrajanje virusa v telesu gostitelja kljub popolnemu delovanju imunskega sistema ter si tako omogoči življenjski prostor za vse življenje gostitelja. Zato njegov namen ni uničiti gostitelja (Cleator in Klapper, 2004).

Za infekcijo z virusom herpes simpleks je potreben tesen stik z okuženo osebo. Virus vstopa skozi sluznico ali skozi drobne ranice na koži. Za HSV 1 je sicer bolj značilna

okužba ustne sluznice in orofarinksa, za HSV 2 pa genitalne sluznice, vendar lahko oba okužita obe mesti (Cleator in Klapper, 2004).

Liza celice je navadno posledica prekinitve sinteze makromolekul celice zaradi vmešavanja virusa, virus lahko celo razgradi celično DNA, poškoduje njeno membrano ali citoskelet. Vsak od načinov poškodbe celice zaradi virusa povzroči lizo celice (Murray in sod., 2002a).

Po reaktivaciji virusa, ki je posledica motnje gostiteljevega imunskega sistema, virus na začetnem mestu okužbe povzroča mehurčasto razjedo, ki je napolnjena s tekočino, v kateri je veliko število virusov (Murray in sod., 2002a). Motnjo v delovanju gostiteljevega imunskega sistema lahko povzroči čustveni ali fizični stres, menstruacija, ultravijolična svetloba ali hormonsko neravnovesje (Cleator in Klapper, 2004). Poškodba tkiva je posledica delovanja virusa kot tudi imunskega odziva gostitelja (Murray in sod., 2002a). V imunskem odzivu gostitelja igrajo pomembno vlogo makrofagi, specifične celice T, komplement, specifična protitelesa ter delovanje limfokinov in citokinov (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.1.1 Patogeneza pri bolnikih z oslabljenim imunskim odzivom

Posebne prirojene napake v delovanju imunskega sistema, kot so hipogamaglobulinemija (zmanjšano število protiteles IgG) ali atipična aplazija priželjca (Di Georgijev sindrom), ne pomenijo izrazito večje dovzetnosti za okužbo ali hujše klinične slike. To kaže na kompleksnost obrambe pred samim virusom. Hujše klinične slike po okužbi z virusom herpesa simpleksa pa se pojavljajo pri novorojenčkih in otrocih ter pri odraslih, ki prejemajo imunosupresivno terapijo. To so bolniki po presaditvi organov. Stopnja bolezenskega stanja pri teh bolnikih je odvisna od vrste in obsega terapije. Hudo obliko okužbe virus povzroča tudi pri bolnikih z aidsem (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.2 Klinična slika okužbe z virusom herpesa simpleksa

HSV 1 in HSV 2 sta virusa, ki povzročata boleče in ponavljajoče spremembe na koži in sluznici. V izjemnih primerih lahko oba povzročata visoko zbolewnost in smrtnost, predvsem, če je prizadeto oko ali možgani ter če se herpes razširi (diseminirani herpes), kar je pogosto pri ljudeh z oslabljenim imunskim odzivom ter pri novorojenčkih (Murray in sod., 2002a).

2.2.2.1 Okužba ust, žrela in ušes

Najpogostejši simptom prve okužbe ustnožrelnega področja z virusom HSV je gingivostomatitis (vnetje ustne votline in dlesni). Inkubacijska doba traja 2-12 dni, bolezenski znaki 2-3 tedne. Simptomi se pojavljajo v obliki bolečih razjed na dlesni, jeziku, ustnicah in grlu. Pri otrocih se lahko pojavijo povečane bezgavke, blaga nevtropenija (znižanje števila nevtrofilcev), povišana količina jetrnih encimov in povišana telesna temperatura do 40 °C (Cleator in Klapper, 2004). Zaradi bolečin pri požiranju ali žvečenju bolnik težko uživa hrano (Alter, 2005). Pri ljudeh z normalnim imunskim sistemom telo bolezen omeji in okrevanje nastopi po 2-3 tednih. Pri starejših bolnikih lahko pride do sindroma mononukleoze, kjer najdemo do 20 % atipičnih limfocitov in limfadenopatijo. Lahko pa bolnik z avtoinokulacijo povzroči endogeno reinfekcijo nosu, kože, oči ali genitalij. Novo mesto na telesu, kjer se bodo pojavili bolezenski znaki, spremlja srbenje in pekoč občutek (Cleator in Klapper, 2004). Pri otrocih omenjene bolezenske znake navadno povzroča HSV 1, pri odraslih pa tako HSV 1 kot HSV 2 (Murray in sod., 2002a).

2.2.2.2 Okužba spolovil

Herpes na spolovilih navadno povzroča HSV 2, lahko pa ga povzroči tudi HSV 1, in sicer v približno 10 % primerov. Prva infekcija navadno poteka brez simptomov. Ko pa se simptomi pojavijo, so pri moških boleče razjede navadno ob korenu penisa in v uretri. Pri ženskah se boleče in srbeče razjede pojavljajo na zunanjem spolovilu, v vagini, na vratu maternice in v perianalnem območju. Pri obeh spolih se lahko poleg bolečih lezij pojavijo tudi povišana telesna temperatura in bolečine v mišicah (Murray in sod., 2002a).

Bolezni znaki trajajo do treh tednov. V primerjavi s herpesom na ustnicah so pri genitalnem herpesu razjede številnejše in vztrajajo dlje časa, možne so tudi sekundarne bakterijske infekcije. Če ima genitalni herpes nosečnica v času poroda, lahko to povzroči hudo infekcijo novorojenčka (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.2.3 Okužba očesa

Infekcija oči z virusom herpesa simpleksa se pojavi kot konjunktivitis (vnetje očesne veznice) na enem ali obeh očesih. Okrevanje pri tipičnih primerih traja tri tedne, lahko tudi več. Skoraj vse primere okužbe oči povzroča HSV 1. Okužba se kaže v razvejanih

ulceracijah na očesni veznici; to stanje spremlja fotofobija, težave z vidom, včasih celo občasna izguba vida. Okužba je navadno omejena na površinske plasti roženice (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.2.4 Neonatalni herpes

Pojav herpesa pri novorojenčkih je od 1 primera na 2500 rojstev do 1,65 na 100.000 rojstev; večinoma ga povzroča HSV 2, vendar se zadnje čase pojavlja vse več primerov, pri katerih je vzrok okužba s HSV 1. Podatek verjetno sovпада z naraščajočim številom primarnih okužb s HSV 1 ter okužbe novorojenčkov takoj po porodu. Ugotovili so, da primarna okužba nosečnice z virusom HSV 1 ali 2 v prvem in drugem tromesečju nosečnosti nima nevarnega vpliva na plod. Tveganje naraste v tretjem tromesečju, takrat lahko pride do znotrajmaternične infekcije (kongenitalna okužba), kar lahko povzroči izgubo ploda ali rojstvo novorojenčka, ki kaže očitne znake bolezni. Najpogosteje pa se plod okuži pri porodu pri prehodu skozi porodni kanal. Prvi znaki bolezni so vidni v 3-21 dneh (Cleator in Klapper, 2004).

Neonatalni herpes je lahko smrten. Pri novorojenčku se lahko kaže na tri načine: z razjedami na koži, ustih in očeh, vidnimi 4-5 dni po porodu, z nevrološkiimi simptomi, opaznimi 17-18 dni po porodu ali z diseminirano obliko bolezni, opazno 11-12 dni po porodu.

Slednja ima najvišjo umrljivost, če ni pravočasne protivirusne terapije; kaže se z odpovedjo jeter, ledvic, centralnega živčnega sistema in s trajnimi poškodbami na očeh in koži (Cleator in Klapper, 2004). Do diseminacije virusa po telesu pride zaradi tega, ker novorojenček še nima razvitega celičnega imunskega odziva (Murray in sod., 2002a). Diagnostika neonatalnega herpesa poteka s preiskavo cerebrospinalne tekočine glede navzočnosti virusne DNA kot tudi s preiskavo krvi, urina ter brisov kože in veziklov (Cleator in Klapper, 2004). Neonatalni herpes lahko kljub zdravljenju pusti posledice, kot so mentalna zaostalost, nevrološke težave, celo smrt (Murray in sod., 2002a).

2.2.2.5 Encefalitis

Encefalitis je akutna bolezen, navadno jo povzroča HSV 1. Smrtnost je visoka kljub protivirusnemu zdravljenju. Bolezen se pojavlja pri ljudeh vseh starosti in skozi vse leto (Murray in sod., 2002a).

Najznačilnejša klinična slika so žariščne lezije na možganih; navadno na čelni strani in na temenu. Z napredovanjem bolezni se stopnjujejo tudi simptomi, ki se kažejo z motnjami v zavesti, v hujših primerih s komo in smrtjo (Cleator in Klapper, 2004).

Herpesni encefalitis je lahko tudi ozdravljiva bolezen, vendar so posledice odvisne od tega, kdaj bolnik prejme protivirusno terapijo. Klasične preiskave možganov, kot so elektroencefalografska preiskava, računalniška tomografija in magnetna resonanca odkrijejo poškodbe, kot so hemoragične in nekrozne razjede na možganih dokaj pozno. Za učinkovito in predvsem hitro diagnostiko ob prvem sumu na herpesni encefalitis je tako zelo primerna kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (RT-PCR). Pravočasna in pravilna protivirusna terapija poveča število bolnikov, ki imajo po preboleli bolezni normalne nevrološke funkcije iz 10 % na 40 %. Količina DNA oziroma število kopij virusne DNA, dokazane v cerebrospinalni tekočini sovпада z resnostjo bolezni ter nam omogoči napoved izteka (Cleator in Klapper, 2004).

Hematogeni razsoj virusa bi morale anatomske ovire, kot so ovira med krvnim obtokom in možgani ter ovira med krvnim obtokom in cerebrospinalno tekočino, omejiti. Da virus povzroči infekcijo možganov, mora preiti te ovire, vendar kako se to zgodi, še ni ugotovljeno (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.2.6 Meningitis

Herpesni meningitis se pojavi v 4-8 % primerov kot posledica primarne okužbe, ki povzroči genitalni herpes. V veliki večini primerov je povzročitelj virus HSV 2, HSV 1 le redko. Simptomi so naslednji: glavobol, povišana telesna temperatura, otrdel vrat, bruhanje in fotofobija. Bolezni so bolj podvržene ženske, vendar okrevanje navadno nastopi samo po 2-7 dneh (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.2.7 Herpesni dermatitis in zanohtni prisad

Herpesni dermatitis je zaplet po primarni infekciji. Pogost je še posebej pri otrocih in dojenčkih. Gre za avtoreinfekcijo, otrok si predvsem s praskanjem okužbo prenese z obraza na druge predele telesa. Virus herpes simpleks sicer ne vstopa skozi normalno zdravo kožo, marveč skozi nevidne ranice, ki nastanejo zaradi praskanja (Cleator in Klapper, 2004).

Pri zobozdravnikih, anesteziistih in bolniškem osebju lahko pride do herpesnega zanohtnega prisada. Podobno se kaže tudi pri ljudeh, ki pogosto grizejo nohte (Cleator in Klapper, 2004). Slika 2 prikazuje klinično sliko herpesnega zanohtnega prisada.



Slika 2: Herpesni zanohtni prisad (Murray in sod., 2002a: 482)

2.2.2.8 Okužbe z virusom herpesa simpleksa pri ljudeh z oslabljenim imunskih odzivom

Bolniki z oslabljenim imunskim odzivom so skupina z visokim tveganjem za okužbe z virusom herpesa simpleksa. V skupino uvrščamo bolnike z napakami v imunskem sistemu, prejemnike organov in krvnih celic in bolnike, okužene z virusom HIV. Zaradi zmanjšane učinkovitosti imunskega sistema prihaja do diseminacije bolezni po vsem telesu. Celo običajen herpes na ustnicah se lahko razvije v hude nekrotične razjede, ki se še bolj zapletejo s sekundarnimi bakterijskimi infekcijami. Pri prejemnikih organov se lahko bolezen širi na požiralnik, dihala, prebavni trakt in centralni živčni sistem. Taka diseminacija okužbe je vsekakor za bolnika izjemno nevarna, možen je smrtni izid. Bolnikom po presaditvi organov se sicer že preventivno daje protivirusna zdravila, kar zmanjša število zapletov, vendar se lahko pojavi tudi odpornost virusa proti zdravilu. Pri bolnikih, okuženih z virusom HIV, lahko HSV deluje kot sodejavnik, ki posamezne celice tako oslabi, da jih virus HIV lažje inficira (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.3 Diagnostika okužb z virusom herpesa simpleksa

V diagnostiki HSV 1 in HSV 2 se navadno uporabljajo neposredne metode določevanja virusov, njihovih antigenov ali nukleinskih kislin. Serološke metode niso primerne pri bolniku z reaktivacijo endogenega virusa, saj med latentno in potekajočo okužbo ni značilne razlike v porastu protiteles. Tako so serološke metode uporabne le pri določevanju primarnih okužb ter v epidemioloških študijah (Murray in sod., 2002a).

2.2.3.1 Histopatološki preparati in svetlobna mikroskopija

Pregled histopatoloških preparatov s svetlobnim mikroskopom se za diagnostiko HSV danes le še redko uporablja. Metoda temelji na vezavi virusnih delcev s specifičnimi protitelesi, ki so označena z encimom (encimskoimunska metoda). Ta metoda lahko da pomembno informacijo o lokaciji virusa (Cleator in Klapper, 2004). Kot vzorec lahko uporabimo brise veziklov ali bioptični material (Murray in sod., 2002a).

2.2.3.2 Elektronska mikroskopija

Kot vzorec se pri tej metodi navadno uporablja negativno kontrastirana tekočina svežega vezikla, ki ga je povzročil HSV. Rezultati so hitri, kar je še posebej pomembno pri imunsko oslabljenih bolnikih, zato je bila ta metoda pred uvedbo PCR še kako pomembna. Morfologija HSV je prepoznavna, vendar je z elektronsko mikroskopijo nemogoče ločiti HSV 1 od HSV 2. Dodatno težavo pa predstavlja dejstvo, da mora vzorec vsebovati najmanj 10^6 virusov v mililitru (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.3.3 Kultivacija virusa na celični kulturi

Virusa HSV 1 in HSV 2 sta ena izmed virusov, ki pri kultivaciji v laboratoriju ne povzročata težav (Cleator in Klapper, 2004). Z njima lahko okužimo več tipov celic, kot so celične linije HeLa, HEp-2, človeške embrionalne fibroblaste in kunčje ledvične celice (Murray in sod., 2002a). Citopatski učinki se pojavijo po enem do sedmih dneh po inokulaciji (Cleator in Klapper, 2004) ter se kažejo kot povečanje celic in napihnenost, nekateri izolati povzročajo celo zlitje sosednjih celic in tako nastanek večjedrnih sincicijev (Murray in sod., 2002a).

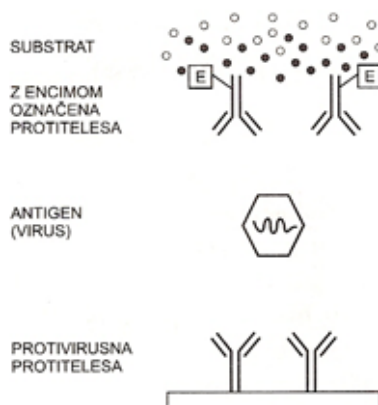
2.2.3.4 Dokazovanje virusnega antigena

Za dokazovanje virusnega antigena uporabljamo encimskoimunsko in imunofluorescenčno metodo. Virus v kužnini neposredno določimo z monoklonskimi protitelesi, ki so označena z encimom ali fluorokromom (Marin, 2002).

Kadar določamo virusne antigene, je občutljivost metode sicer manjša kot pri kultivaciji virusa, vendar pa lahko antigene določimo tudi takrat, kadar kužnina ni med najkakovostnejšimi, bodisi zaradi nepravilnega odvzema bodisi zaradi nepravilnega transporta ali hranjenja. Vsekakor pa je dokazovanje virusnega antigena veliko hitrejše (v nekaj urah) kot kultivacija in opazovanje citopatskih učinkov (nekaj dni) (Marin, 2002).

2.2.3.4.1 Encimskoimunska metoda

Metodo odlikuje visoka občutljivost, saj lahko z njo določimo manj kot 1 ng virusnega antigena v kužnini. Najpogosteje uporabljamo metodo z dvojnimi protitelesi – primarnimi in sekundarnimi, ki so označena z encimom – tako imenovana sendvič metoda. Po dodatku substrata encim tvori netopen obarvan produkt, kar določimo z opazovanjem spremembe barve ali z merjenjem optične gostote (Marin, 2002). Shema delovanja encimskoimunske metode za dokazovanje virusnega antigena prikazuje slika 3.

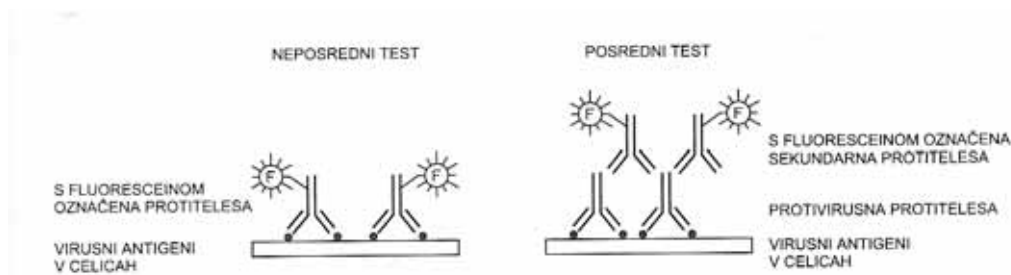


Slika 3: Shema encimskoimunske metode za dokazovanje virusnega antigena (Marin, 2002: 116)

2.2.3.4.2 Imunofluorescenca

Virusni antigen določimo z vezavo specifičnih protiteles, ki so označena s fluorokromi. V kompleksu antigen – protitelo fluorokrom po vzdraženju s svetlobo krajše valovne dolžine

odda svetlobo daljše valovne dolžine. Učinek se opazuje s fluorescenčnim mikroskopom. Označena protitelesa lahko vežemo na antigen neposredno ali posredno. Drugo različico uporabljamo, kadar nimamo na voljo primarnih protiteles, ki bi bila označena s fluorokromi. Sekundarna protitelesa namreč niso virusno specifična, temveč vrstno (Marin, 2002). Neposredno in posredno različico imunofluoresce prikazuje slika 4.



Slika 4: Neposredna in posredna imunofluorescenca (Marin, 2002: 117)

2.2.3.5 Dokazovanje nukleinskih kislin

Nukleinske kisline virusnega povzročitelja lahko dokazujemo v okuženih celicah z različnimi metodami, kot je hibridizacija z oligonukleotidi, ki so označeni z encimom ali radioaktivnimi izotopi, vendar se te metode opuščajo. Njihovo mesto so v glavnem prevzele metode pomnoževanja nukleinskih kislin ter njihova kombinacija s hibridizacijo (odtis Southern in ELISI podobna hibridizacija). V vsakodnevni diagnostiki se čedalje bolj uveljavlja PCR v realnem času, ki navadno omogoča tudi ločevanje med HSV 1 in HSV 2. Omenjene metode spremljajo natančne kontrole kvalitete izvedbe postopka: notranja kontrola ter kontrola kvalitete vzorca in postopka izolacije DNA, to je inhibitorna kontrola. Rezultati so tako hitri in zanesljivi (Cleator in Klapper, 2004).

PCR se največ uporablja pri sumu na herpesni encefalitis in meningitis. Študije pričajo o visoki občutljivosti, 95-100 % in podobno visoki specifičnosti, 98-100 %. Do lažno negativnih rezultatov pa seveda lahko pride, če je vzorec odvzet prezgodaj, v prvih treh dneh, ali po začetku protivirusne terapije. Previdnost pri interpretaciji je seveda potrebna, saj PCR ni nezmotljiv, vendar je to trenutno najhitrejša in najzanesljivejša metoda. Prav tako je pomembna kvantifikacija virusne DNA v vzorcu, kar omogoča PCR v realnem času, saj je od virusnega bremena odvisna terapija in napoved izida: bolniki, ki imajo v likvorju več kot 100.000 kopij DNA v mililitru, imajo zelo majhne možnosti za popolno

ozdravitev. Hitra diagnostika je izredno pomembna, saj hitreje postavljena diagnoza pomeni boljšo prognozo za pacienta (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.4 Epidemiologija virusa herpes simpleks

Virus herpes simpleks je razširjen po vsem svetu, vendar nima živalskega rezervoarja (Cleator in Klapper, 2004) in je človek edini rezervoar (Murray in sod., 2002a). Okužena oseba je vir okužbe vse življenje. Virus se prenaša s tekočino v mehurčkih (Murray in sod., 2002a).

Epidemiološke značilnosti virusa herpesa simpleksa se navadno določa s serološkimi metodami (Cleator in Klapper, 2004) ali z molekularnimi metodami, najpogosteje z restrikcijskimi profili PCR pridelkov (RFLP) (Murray in sod., 2002b).

2.2.4.1 Virus herpes simpleks 1 (HSV 1)

Do okužbe pride ob tesnem stiku z bolnikom, ki je aktivni prenašalec virusa. Najpogostejši način primarne okužbe je s poljubljanjem, lahko tudi z uporabo istega kozarca za pitje, zobno ščetko ali z drugimi predmeti, ki so kontaminirani s slino. Možen je tudi prenos okužbe z ustne sluznice drugam po telesu, kjer virus okuži novo mesto skozi majhne ranice na koži (Murray in sod., 2002a).

Zaradi velikega števila okužb pri odraslih, ki so asimptomatske, je število okuženih ljudi ocenjeno prenizko (Cleator in Klapper, 2004), vendar v državah v razvoju doseže delež okuženega prebivalstva do 90% (Murray in sod., 2002a). Novorojenčki se lahko uspešno izognejo okužbi v prvih šestih do devetih mesecih s pasivno imunostjo od matere. Zaradi tega se dojenčki okužijo kasneje (Cleator in Klapper, 2004).

Delež okuženega prebivalstva sovпада z nižjim ekonomsko-socialnim statusom, in sicer pri ljudeh z nižjim ekonomsko-socialnim statusom je starost ob primarni okužbi nižja. Kljub temu pa je število okuženih pri obeh skupinah približno enako (Cleator in Klapper, 2004).

2.2.4.2 Virus herpes simpleks 2 (HSV 2)

Najpogostejši način prenosa je s spolnim stikom. Možna pa je tudi avtoinokulacija z drugih mest na spolovila ali okužba novorojenčka ob porodu od okužene matere. Odvisno od

spolnih navad in higiene lahko HSV 2 povzroča bolezenske znake na genitalijah, anorektalnih predelih in orofarinksu (Murray in sod., 2002a).

Čas primarne okužbe s HSV 2 je kasnejši kot s HSV 1, kar sovpada z začetkom spolnih odnosov. Vendar je potrebno še enkrat poudariti, da lahko oba virusa povzročata okužbo na obeh značilnih predelih, tako na ustih, očeh, orofarinksu kot na genitalnem območju (Murray in sod., 2002a).

2.3 VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV)

Virus Epstein-Barr (EBV) je leta 1964 odkril in prvič opisal Denis Burkitt. Povezal ga je z tumorjem v predelu spodnje čeljusti, ki se še danes imenuje po njem Burkittov limfom (Crawford, 2004).

EBV je DNA virus, član družine *Herpesviridae*, poddružine *Gammaherpesvirinae*, rodu *Lymphocryptovirus*. Virus je zelo razširjen, odstotek okuženega prebivalstva narašča s starostjo; odraslo prebivalstvo je tako okuženo kar v 90 %. Igra pomembno vlogo kot sodejavniki pri razvoju limfoproliferativnih boleznih (Crawford, 2004). Povezujejo ga tudi z nastankom Hodgkinove bolezni, karcinoma nosnega žrela in limfomi v stanjih prirojenih ali pridobljenih napak v delovanju imunskega sistema (Murray in sod., 2002a). Infekcijsko mononukleozo, različne limfoproliferativne motnje in kronično infekcijo z EBV zasledimo navadno ob primarni okužbi z EBV, Burkittov limfom, nazofaringealni karcinom ter druge težke oblike limfoproliferativnih boleznih, ki navadno nastopijo pri imunsko oslabljenih ljudeh, pa kot posledico reaktivacije virusa (Hardie, 1999). Bolezen nastane zaradi pospešenega razmnoževanja limfocitov B, kar povzroči nenadzorovane delitve celic in tako razvoj limfomov (Murray in sod., 2002a).

Zgradba virusa EBV je zelo podobna zgradbi HSV; pod elektronskim mikroskopom ju ne moremo ločiti. Znotraj kapside, ki je iz 162 kapsomer, leži linearna dvojnovijska DNA. Virus inficira limfocite B, po okužbi v njih vzpostavi latentno stanje. Genom virusa se ne vgradi v celičnega, temveč se zaokroži s terminalnimi ponavljajočimi zaporedji. To obliko imenujemo episom. Episom se pomnožuje skupaj s celično DNA in pridobi veliko število kopij v zelo kratkem času po infekciji, poleg tega pa se enakomerno razporeja tudi v hčerinske celice, ki nastanejo po celični delitvi. Episom lahko sproži tudi lizo celice in sprostitve virusov (Crawford, 2004).

2.3.1 Vrste okužb in patogeneza virusa Epstein-Barr

Do primarne infekcije prihaja najpogosteje z okuženo slino prenašalca virusa, prenos s krvjo ali zrakom ni zelo pogost. Aktiven prenašalec je lahko bolnik z infekcijsko mononukleozo, vendar virus občasno najdemo tudi v slini zdravih ljudi. Tako je okužbo z EBV skoraj nemogoče preprečiti (Schmid, 2005).

Okužba z EBV se lahko izide na tri načine:

- EBV se razmnožuje v limfocitih B ali epitelijskih celicah, ki so dovzetne za okužbo z EBV
- EBV po primarni okužbi vzpostavi latentno stanje v limfocitih B kljub delujočim limfocitom T
- EBV lahko stimulira rast limfocitov B in prepreči njihovo smrt (Murray in sod., 2002a)

2.3.2 Proteini EBV

2.3.2.1 Latentni proteini

Poglaviten način patogeneze virusa EBV je, da po primarni okužbi vzpostavi v limfocitih B latentno stanje. V tem času je izraženih devet proteinov, za katere zapis leži na virusnem genomu. V okuženih limfocitih B, ki so posledično nesmrtni, so pomembni štiri jedrni antigeni (EBNA): EBNA1, EBNA2, EBNA3A in EBNA3C so zadolženi za vzpostavitev nesmrtnosti celic, kar je bilo dokazano tudi v *in vitro* sistemu. EBNA1 je 20-45 kDa velik protein iz ponavljajočih se glicin-alanin aminokislinskih ostankov. Protein se veže na mesto, kjer se začne podvojevanje virusne DNA z enega konca, z drugim koncem pa na celične kromosome v času metafaze. Tako je zadolžen za enakomerno ohranjanje episoma v starševskih in hčerinskih celicah po celični delitvi. EBNA1 je odporen proti razgradnji s proteosomom in posledično okužene celice na svoji površini ne izražajo peptidov, ki bi bili tarča citotoksičnih limfocitov T. Proteinu ne pripisujejo onkogenega delovanja. EBNA2 je 86 kDa velik protein, prav tako kot EBNA1 igra vlogo pri vzpostavitvi nesmrtnosti limfocitov B, poleg tega pa aktivira druge virusne proteine v času latence ter celične proteine, vključno s celičnimi onkogeni *c-myc* in *c-fgr*. EBNA3A, EBNA3B in EBNA3C so veliki od 140 do 180 kDa, vsi trije inhibirajo prepis genov, za katere aktivacijo je zadolžen EBNA2 ter tako uravnatežijo aktivnost EBNA2. Pri vzpostavitvi nesmrtnosti celic igrata vlogo le EBNA3A in EBNA3C. EBNA-LP (angl. Leading protein) pri

vzpostavitvi nesmrtnosti ni bistven, vendar s svojo aktivnostjo dopolni vlogo EBNA2 ter tako poveča učinek njegovega delovanja (Crawford, 2004).

2.3.2.2 Latentni membranski proteini (angl. LMPs)

Ekspresija LMP1 inducira EBNA2. Protein je v plazemski membrani inficiranih celic, tvori povezavo s citoskeletom. Njegova vloga je pomembna pri nesmrtnosti okuženih celic, izražanju tumorigenega fenotipa, poveča ekspresijo adhezijskih molekul celic CD23 in CD40, inducira aktivacijo limfocitov B in DNA sinteze.

LMP2A vpliva na delovanje tirozin kinaze, kar zavre aktivacijo limfocitov B in s tem litični cikel virusne replikacije. S tem omogoči celicam preživetje, virusu pa vzdrževanje latentnega stanja. Funkcija LMP2B je še neznan (Crawford, 2004). Navzočnost proteinov pri Burkittovem limfomu in drugih malignih boleznih, v katere je vpleten EBV, prikazuje preglednica 1.

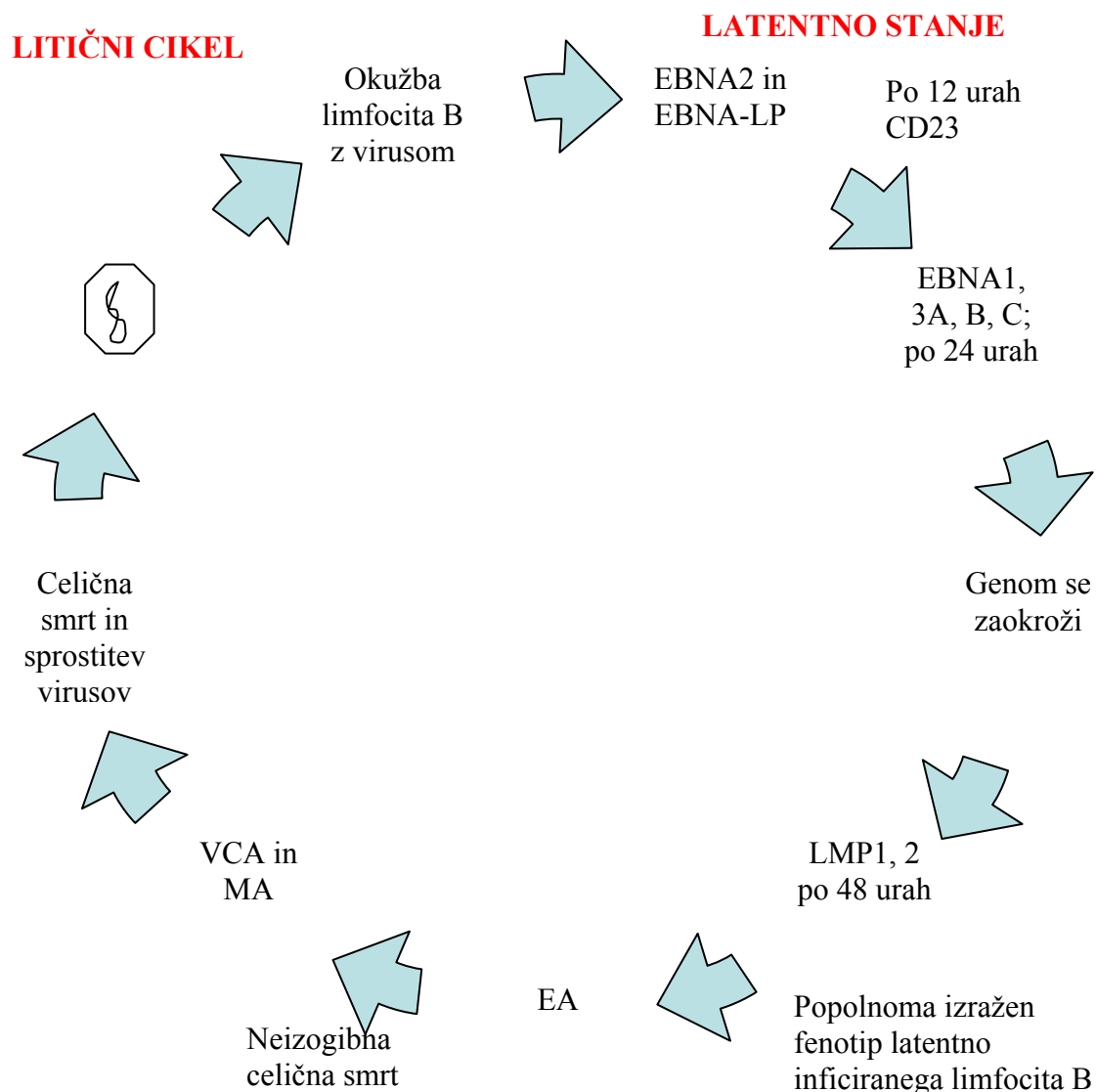
Preglednica 1: Posamezne virusne beljakovine pri boleznih, s katerimi je povezan EBV (Crawford, 2004: 126)

Protein	Burkittov limfom	Karcinom nosnega žrela	Hodgkinova bolezen	Limfoproliferativne bolezni po presaditvi organov
EBNA1	+	+	+	+
EBNA2	-	-	-	+
EBNA3A	-	-	-	+
EBNA3B	-	-	-	+
EBNA3C	-	-	-	+
EBNA-LP	-	-	-	+
LMP1	-	±	+	+
LMP2A	-	+	+	+
LMP2B	-	+	+	+

2.3.2.3 Vzpostavitev nesmrtnosti celic

Štiriindvajset ur po okužbi celic virus povzroči blastogenezo (spodbuditev nesenzibiliziranih limfocitov k mitozii) počivajočih limfocitov B, poveča se velikost

celičnega jedra, volumen citoplazme ter izražanje CD23 antigenkega receptorja na površini limfocita. Po 36 urah se sproži podvojevanje celične DNA in celična delitev. Vse to vodi v nesmrtnost celice, ki je navadno trajna, saj ko se enkrat sproži sinteza DNA, se celice nenehno delijo (Crawford, 2004). Shematski prikaz ekspresije genov EBV v odvisnosti od časa in dogodki v celici po infekciji, ki nastopijo kot posledica ekspresije, prikazuje slika 5.



Legenda: EBNA - Epstein Barr virusni jedrni antigeni
LMP - latentni membranski proteini
MA - membranski proteini
VCA - virusni kapsidni proteini
EA - zgodnji proteini

Slika 5: Shematski prikaz časovne ekspresije genov EBV in spremljajoči dogodki v celici po infekciji (Crawford, 2004: 129)

2.3.3 Klinična slika okužbe z virusom Epstein-Barr

2.3.3.1 Infekcijska mononukleoza

Infekcijska mononukleoza (IM) je akutna, limfoproliferativna bolezen, ki je posledica primarne okužbe z virusom EBV. Pogosti simptomi IM so povišana telesna temperatura, vnetje žrela, otečene limfne žleze (Schmid, 2005; Hardie 1999), slabokrvnost, utrujenost, občutek slabosti (Hardie, 1999). Simptomi se pojavijo 4 - 7 tednov po okužbi (Hardie, 1999) in lahko trajajo več mesecev, celo več kot pol leta. Takrat lahko bolezen označimo za kronično okužbo z virusom EBV (Schmid, 2005). Pri ljudeh z normalnim delovanjem imunskega sistema telo samo zameji bolezen (Hardie, 1999).

2.3.3.2 Burkittov limfom

Burkittov limfom je maligni tumor, ki se najpogosteje pojavlja pri otrocih, in sicer v predelu spodnje čeljusti. Vzročno povezanost virusa EBV in Burkittovega limfoma nakazujejo naslednja spoznanja:

1. Genom virusa EBV so dokazali v večini tumorskih celic Burkittovega limfoma
 2. Virus EBV rakavo spreminja kulture normalnih človeških limfocitov
 3. Rakave celice z genomom virusa EBV izražajo jedrne antigene EBNA, ki so podobni tumorskim antigenom T drugih onkogenih virusov z DNA
 4. Virus EBV povzroča tumorje pri opicah
 5. V serumu bolnikov z Burkittovim limfomom so protitelesa proti antigenom virusa EBV
- Virus namreč povzroči prenos celičnega onkogene *myc* iz kromosoma 8 na kromosome 2, 14 ali 22. To naj bi spodbudilo prepisovanje onkogene in rakavo spreminjanje celic (Koren, 2002).

2.3.3.3 Rak nosnega žrela (nazofaringealni karcinom)

Je maligni tumor, ki je najbolj razširjen na jugu Kitajske, vendar se pojavlja tudi drugod po svetu. Virus EBV so z rakom nosnega žrela povezali na podlagi naslednjih dejstev:

- V rakavih celicah je vedno genom virusa EBV ter antigeni EBNA
- Pri vseh bolnikih z rakom nosnega žrela so dokazali v serumu in slini protitelesa proti virusu EBV

- Količina protiteles narašča z napredovanjem bolezni in rastjo tumorja

Kljub mnogim dejstvom, ki virus EBV povezujejo z nastankom tako Burkttovega limfoma kot raka nosnega žrela, za takšne zaključke ni popolnih dokazov. Tumorja sta namreč značilno zemljepisno in rasno omejena, kar kaže na pomembnost genetskih in drugih spremljajočih dejavnikov. Je pa virus EBV sigurno eden izmed pomembnih sodejavnikov pri nastanku (Koren, 2002).

2.3.3.4 Limfoproliferativni sindrom

Je redka maligna bolezen z značilno proliferacijo z virusom EBV okuženih limfoblastov. Pojavlja se pri otrocih, ki imajo prirojene napake v imunskem sistemu (Koren, 2002).

2.3.3.5 Okužba z virusom EBV pri bolnikih z zmanjšanim imunskim odzivom

Virus EBV v gostitelju vzpostavi doživljenjsko okužbo limfocitov B in v slini ga občasno najdemo pri več kot 90 % prebivalstva. Pri nadzorovanju okužbe imajo glavno vlogo citotoksični limfociti T in zato ni presenetljivo, da zmanjšana imunska sposobnost v celičnem imunskem odzivu, sovpada s povišanim številom virusov v slini, visokih koncentracijah protiteles proti antigenom, ki sodelujejo pri litičnem ciklu virusa ter povišanem številu okuženih limfocitov. V takih primerih lahko pride do razvoja limfomov (Crawford, 2004).

2.3.3.5.1 Okužba z virusom EBV pri bolnikih po presaditvi organov in krvnih celic

Imunosupresivna terapija, ki sledi presaditvi organa ali celic pogosto povzroči nastanek tumorjev, ki so povezani z virusi (Crawford, 2004). Limfomi limfocitov B, ki so lahko polimorfni ali monomorfni (Webber, 2006), so namreč drugi najpogostejši tumorji, ki se pojavljajo pri prejemnikih organov. Razvijejo se pri 10 odstotkih bolnikov (Crawford, 2004). Najpogosteje se razvijejo na območju prebavil, v 39 odstotkih, in dihal v 25 odstotkih (Webber, 2006). Rizični dejavnik pri razvoju tumorja igra imunosupresivna terapija in morebitna primarna okužba, če se bolnik prej še ni srečal z virusom (Crawford, 2004). Vir primarne okužbe je lahko presajeni organ ali kri, ki jo bolnik prejme s transfuzijo, saj je večina darovalcev krvi in organov seropozitivnih na EBV (Aucejo in sod., 2005). To je še posebej pogosto pri otrocih. Imunosupresivna zdravila pa zavrejo

delovanje citotoksičnih limfocitov T, ki drugače kontrolirajo okužbo z EBV, kar omogoča nekontrolirano rast in razmnoževanje okuženih limfocitov B (Crawford, 2004). Kombinacija virusnega bremena in število zavrtih za EBV specifičnih limfocitov T predstavlja stopnjo tveganja za bolnika. Pomembno je dejstvo, da je limfoproliferativnih motenj po presaditvi organov ali krvnih celic, ki niso v povezavi z EBV, manj kot 5 odstotkov (Aucejo in sod., 2005).

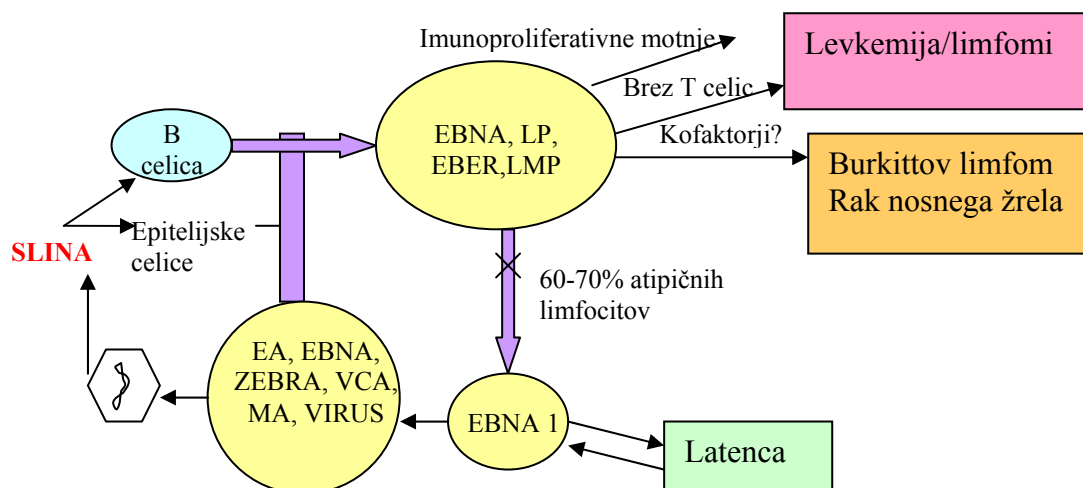
2.3.3.5.2 Oralna lasasta levkoplakija

Oralna lasasta levkoplakija je možen izid produktivne okužbe z virusom EBV. Gre za okužbo epiteljskih celic, kar povzroča razjede na robu jezika. To je klinični izvor oportunistične okužbe, ki se pojavlja pri bolnikih z aidsem (Murray in sod., 2002a).

2.3.3.6 Od okužbe do bolezni

Okužba celic B in epiteljskih celic orofarinksa, na primer mandljev, se nadaljuje s širitvijo virusa v slino, čemur sledi možen prenos na naslednjega gostitelja in širjenje virusa v druge celice B. EBV deluje kot mitogen, česar posledica so B-limfoblastoidne celične linije. Zaradi prekomernega namnoževanja celic B lahko pride do nastanka limfoma. Kot odgovor na okužbo nastanejo najprej protitelesa proti virusnim kapsidnim proteinom (VCA), membranskim antigenom (MA) in zgodnjim virusnim antigenom (EA), kasneje v poteku bolezni proti jedrnim antigenom EBV (EBNA). V boju proti okuženim celicam B imajo glavno vlogo limfociti T, vendar EBV producira analog interlevkina 10, BCRF-1, katerega vloga je inhibicija limfocitov T. Infekcijska mononukleoza je tako vojna med okuženimi celicami B in limfociti T. Klasična limfocitoza (povečano število mononuklearnih celic), povezana z infekcijsko mononukleozo, je posledica aktivacije in proliferacije celic T, imenovanih atipični limfociti oziroma Downeyjeve celice. Po okrevanju ostane v približno eni celici B v mililitru krvi virus, ki se lahko kadarkoli kasneje v življenju reaktivira (Murray in sod., 2002a).

Napredovanje okužbe z virusom EBV in nastanek limfoma v odvisnosti od virusnih beljakovin prikazuje slika 6.



- Legenda: EA – zgodnji antigeni
EBER – Epstein-Barr RNA
EBNA – Epstein-Barr jedrni antigeni
LMP – latentni membranski proteini
LP – latentni proteini
MA – membranski antigen
VCA – virusni kapsidni protein
ZEBRA - protein kodiran na Z regiji

Slika 6: Napredovanje okužbe z virusom EBV (Murray in sod., 2002a: 489)

2.3.4 Diagnostika okužb z virusom Epstein-Barr

Infekcijsko mononukleozo navadno spoznamo po simptomih, po atipičnih limfocitih, limfocitozi (mononuklearne celice, katerih 60-70 odstotkov predstavljajo bele krvne celice, 30 odstotkov pa atipični limfociti) in pozitivnih seroloških testih. Atipični limfociti so najzgodnejši znak okužbe, pojavijo se ob začetku bolezni in izginejo ob koncu bolezni. Heterofilna protitelesa se pojavijo približno en teden po okužbi kot rezultat mitogene aktivacije limfocitov B zaradi EBV. Serološke teste uporabljamo za potrditev diagnoze, določa se protitelesa proti antigenom VCA, EA in EBNA (Crawford, 2004).

Preglednica 2 prikazuje navzočnost celičnih protiteles proti virusnim antigenom v odvisnosti od bolnikovega kliničnega statusa.

Preglednica 2: Serološki profil okužbe z virusom EBV (Murray in sod., 2002a: 492)

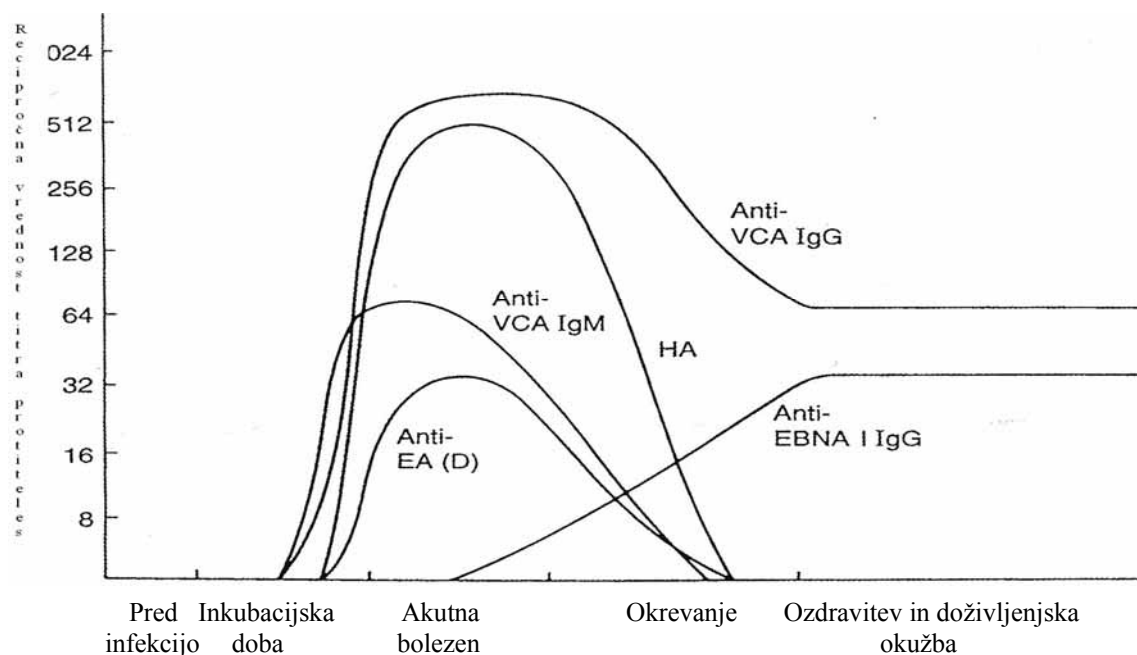
Bolnikov klinični status	Heterofilna protitelesa	EBV specifična protitelesa			
		VCA-IgM	VCA-IgG	EA	EBNA
Pred okužbo	-	-	-	-	-
Akutna primarna okužba	+	+	+	±	-
Kronična okužba	-	-	+	+	-
Prebolela okužba	-	-	+	-	+
Reaktivacija	-	-	+	+	+
Burkittov limfom	-	-	+	+	+
Rak nosnega žrela	-	-	+	+	+

Legenda: VCA – virusni kapsidni antigeni

EA – zgodnji proteini

EBNA – jedrni antigeni virusa Epstein - Barr

Slika 7 grafično prikazuje količino protiteles proti virusnim beljakovinam v odvisnosti od začetka okužbe.



Legenda: HA - heterofilna protitelesa

EA (D) - difuzna oblika zgodnjih antigenov

VCA - virusni kapsidni protein

EBNA - Epstein-Barr jedrni antigeni

Slika 7: Časovna dinamika nastanka protiteles pri okužbi z EBV (Crawford, 2004: 133)

Serološke teste uporabljamo za določitev virusnega povzročitelja, ocenitev poteka bolezni in ugotovitev stopnje okužbe: primarne okužbe, reinfekcije virusa, kronične okužbe v preteklosti in drugo. Rezultati seroloških testov vsebujejo podatke o navzočnosti določenih protiteles, kar izražamo s titrom ali enotami. Za EBV se v serologiji navadno uporabljata dve metodi določevanja protiteles in sicer indirektna imunofluorescenca in encimskoimunski test (ELISA) (Murray in sod., 2002c). Pri prvi so sekundarna protitelesa, ki se vežejo na bolnikova, označena s fluoresceinom, nastali imunski kompleks opazujemo z fluorescenčnim mikroskopom. Pri metodi ELISA pa so sekundarna protitelesa označena z encimom, najpogosteje z alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo. Po dodatku ustreznega substrata, se aktivira encim in razgrajuje substrat. Iz količine porabljenega substrata lahko sklepamo na količino protiteles v bolnikovem serumu (Avšič-Županc, 2002).

2.3.5 Epidemiologija virusa Epstein-Barr

Za epidemiološke študije se navadno uporablja serološke metode za določevanje IgG protiteles proti antigenu VCA, saj se pojavijo zgodaj po primarni okužbi in jih lahko zaznamo vse življenje. Seropozitivnost populacije narašča s starostjo in v odrasli populaciji doseže delež 90 odstotkov. Zaznamo pa dve točki, kjer ta odstotek sunkovito naraste. To je pri otrocih iz starostne skupine 1 - 6 let ter v času pubertete pri mladostnikih. Pri otrocih je namreč najpogostejši vzrok prenosa skupna uporaba igrač, ki jih pa otrok lahko zanese tudi v usta, pri mladostnikih pa poljubljanje (Crawford, 2004).

Primarna okužba je lahko asimptomatska, pri ljudeh z oslabiljenim imunskim sistemom pa celo ogroža življenje, saj se lahko pri njih razvijejo različne limfoproliferativne motnje (Murray in sod., 2002a).

2.4 MOŽNOSTI IN RAZVOJ DIAGNOSTIKE OKUŽB S HSV 1, HSV 2 IN EBV

Kot že omenjeno, se v diagnostiki HSV večinoma uporabljajo neposredne metode, kot je poskus osamitve virusa, elektronska mikroskopija ter dokazovanje antigena z encimskoimunsko metodo ali imunofluorescenca. Med neposredne metode spada tudi dokazovanje nukleinskih kislin, ki se vedno bolj uveljavlja in se uporablja že v redni diagnostični dejavnosti (Niesters, 2002).

Preglednica 3 podaja rezultate raziskave, narejene na vzorcih 110 bolnikov, pri katerih je obstajal sum na okužbo s HSV 1 ali HSV 2. Vzorčni material so bili brisi genitalnih in kožnih sprememb, testirani so bili s tremi metodami, in sicer z nested – PCR (n-PCR), s PCR v realnem času ter z osamitvijo virusa (Schmutzhard in sod., 2002). Pozitivne rezultate v deležih prikazuje preglednica 3.

Preglednica 3: Primerjava pozitivnih rezultatov, dobljenih s tremi metodami v diagnostiki okužb s HSV 1 in HSV 2 (Schmutzhard in sod., 2002: 120)

	Izolacija (%)	n – PCR (%)	PCR v realnem času (%)
HSV 1	22	22	24
HSV 2	25	37	36

Drugi avtorji (Smith in sod., 2004) poročajo o pomembnosti PCR v realnem času in tudi utemeljujejo, zakaj zamenjuje kultivacijo virusa na celičnih linijah. Rezultati pregleda kužnin, kot so brisi kožnih razjed, razjed na spolovilu, brisi očne veznice ter bronhoalveolarni izpirki, testirani s PCR v realnem času, so bili v primerjavi s kultivacijo v veliko večjem deležu pozitivni (20-53 odtokov) (Smith in sod., 2004).

V diagnostiki EBV so se zaradi podrobnega poznavanja dinamike protiteles, ki se tvorijo kot odgovor na virusne antigene, uporabljale serološke metode, katere pa prav tako kot pri diagnostiki okužb s HSV, kadar so potrebni hitri rezultati, zamenjuje dokazovanje nukleinskih kislin. Pri bolnikih po presaditvi organov lahko pride do reaktivacije latentnega EBV, kar lahko povzroči hud zaplet. Dokaz nukleinske kisline EBV pred ali po presaditvi organa nam omogoča, da bolnik pravočasno prejme protivirusno zdravlilo (Niesters, 2002).

PCR v realnem času je dokazano visoko občutljiva in specifična metoda (Doornum in sod., 2002). Preglednica 4 prikazuje primerjavo specifičnosti in občutljivosti testa za diagnostiko HSV 1 in 2 z metodama kultivacije virusa in PCR v realnem času.

Preglednica 4: Primerjava občutljivosti in specifičnosti testa za diagnostiko okužb s HSV 1 in 2 z metodo kultivacije virusa in PCR v realnem času (Doornum in sod., 2002: 578-9)

	Kultivacija virusa v primerjavi s PCR		PCR v realnem času v primerjavi s kultivacijo	
	občutljivost	specifičnost	občutljivost	specifičnost
HSV 1	86,0 %	99,2 %	96,9 %	96,3 %
HSV 2	73,2 %	99,8 %	98,6 %	95,6 %

Meja občutljivosti posameznega testa je odvisna tako od reagentov, kot od instrumentov in izvajalca. Za sistem LightCycler poročajo o občutljivostni meji med 100 in 1000 kopij na mililiter vzorca (Read in sod., 2001), nekateri celo od 1 do 100 kopij na mililiter (Nicoll in sod., 2001).

Za PCR v realnem času sta pomembni dve dejstvi:

1. Pomnoževanje DNA in zaznavanje PCR produktov poteka v zaprtem sistemu, kar močno zmanjša možnost kontaminacije
2. Uporaba hibridizacijskih fluorescirajočih sond, ki s prenosom energije na detektor fluorescence v sistemu omogočajo analizo in karakterizacijo produktov, kot je genotipizacija ali določanje temperature tališča DNA (Smith in sod., 2004; Read in sod., 2001).

V diagnostiki herpesvirusov se PCR v realnem času uporablja za določevanje virusne DNA HSV 1 ali 2 v likvorjih, redkeje v drugih kužninah, DNA EBV pa likvorjih in v krvi (Smith in sod., 2004).

2.5 KEMIZEM METODE PCR V REALNEM ČASU

2.5.1 Princip delovanja instrumenta LyghtCycler

Detekcija PCR produktov poteče po vsakem zaključenem ciklu ali med potekom cikla, ki sestoji iz denaturacije, prileganja začetnih oligonukleotidov in pomnoževanja. Reakcija poteka v tankih kapilarah iz stekla, kar omogoča tesno prileganje reakcijske mešanice k stenam kapilare, kar je pomembno pri zaznavanju nastalega produkta. Zaznava PCR produkta poteka s sondami, ki so označene s fluoroforom, ki po vzpodbuditvi z zunanjim virom odda fluorescenčno svetlobo, kar zazna instrument (Smith in sod., 2004).

2.5.2 Virus herpesa simpleksa 1 in 2 ter PCR v realnem času na instrumentu LightCycler

2.5.2.1 Mehanizem detekcije PCR pridelka s hibridizacijskimi sondami

Mehanizem zaznavanja PCR produktov temelji na paru hibridizacijskih sond oziroma dveh kratkih oligonukleotidih, ki nalegata na specifično zaporedje znotraj pomnoževanega

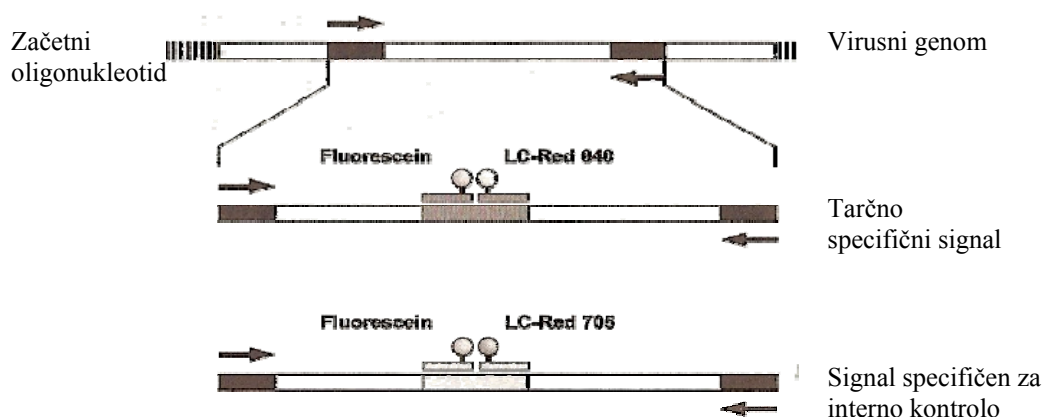
zaporedja, ko se vežejo začetni oligonukleotidi. Prva sonda je na 5' koncu označena z LC-Red 640 (LightCycler-Red-640-N-hidroksi-sukcinimid ester), na 3' koncu pa je modificirana tako, da ne more priti do pomnoževanja. Druga je na 3' koncu označena s fluoresceinom. Po vezavi na pomnoževano zaporedje DNA se sondi vežeta tako, da sta v neposredni bližini, kar rezultira v prenosu energije v obliki fluorescence med obema fluoroforoma (Kit for detection..., 2003). Sonda, ki je označena s fluoresceinom, je donorska in je vzbujena z zunanjim virom svetlobe, ki je vgrajen v instrument (Smith in sod., 2004). Del energije, ki jo fluorescein odda, absorbira akceptorski fluorofor, LC-Red 640 (Kit for detection..., 2003). Fluorescenca, ki jo akceptorski fluorofor odda, se lahko izmeri in je sorazmerna količini produkta (Smith in sod., 2004).

2.5.2.2 Ločevanje med HSV 1 in HSV 2

Ločevanje med HSV 1 in HSV 2 poteka na osnovi informacije o temperaturi tališča DNA pozitivnih vzorcev. Informacijo nam posreduje sonda, ki je označena z LC-Red 640. Zaradi različne sestave nukleotidnega zaporedja, kjer se sonda veže na virusno DNA, imata namreč HSV 1 in HSV 2 signifikantno različno temperaturo tališča tega zaporedja. Tako nam ta sonda pri valovni dolžini svetlobe 640nm, s čimer jo vzdražimo, posreduje podatke o temperaturi tališča DNA pozitivnega vzorca. Ta temperatura za HSV 1 znaša okoli 54 °C, za HSV 2 pa okoli 66 °C. Tako lahko ločimo HSV 1 od HSV 2 (Kit for detection..., 2003).

2.5.2.3 Kontrola navzočnosti inhibitorjev PCR

V primeru nečistega vzorca so lahko navzoči inhibitorji, ki inhibirajo samo reakcijo s polimerazo zaradi oviranja delovanja encima polimeraze. Zato je k reagentom diagnostičnega kompleta dodana tako imenovana interna kontrola. Interna kontrola je umetno sintetizirana dvovijačna DNA, ki vsebuje identična mesta, na katera se vežejo začetni oligonukleotidi, vendar pa se nanj veže drugačna hibridizacijska sonda kot na tarčno zaporedje. Označena je s fluoroforom LC-Red 705 (LightCycler-Red-705-N-hidroksi-sukcinimid ester) in jo vzorcu dodamo pred pomnoževanjem s polimerazo. Uspešno pomnoževana interna kontrola, kar izmerimo pri valovni dolžini 705 nm, s čimer jo vzdražimo, da odda fluorescenco, pomeni, da ni inhibitorjev polimeraze in da so negativni rezultati zanesljivi (Kit for detection..., 2003). Slika 8 prikazuje shemo načina zaznavanja PCR pridelka in pomnoževane notranje kontrole.



Slika 8: Shema zaznavanja PCR pridelka in pomnoževane interne kontrole (Kit for detection..., 2003:5)

2.5.2.4 Pomen negativne in pozitivne kontrole

Negativna in pozitivna kontrola sta vključeni v vsakem testu. V kapilari so enaki reagenti kot v testnih kapilarah; negativna kontrola namesto vzorčne DNA vsebuje vodo, pozitivna kontrola pa plazmidno DNA virusa HSV. Da lahko zagotovimo uspešno interpretacijo in s tem zanesljivost dobljenih rezultatov, mora negativna kontrola dati negativen rezultat testiranja na DNA HSV, pozitivna pa pozitiven (Kit for detection..., 2003).

Namen pozitivne in negativne kontrole je, da izključimo lažno negativne ali lažno pozitivne rezultate. PCR je namreč izredno občutljiva metoda in v primeru navzkrižne kontaminacije lahko zazna tudi eno samo kopijo genoma virusa, s katero smo kontaminirali izvorno negativen vzorec. Za zmanjšanje števila lažno pozitivnih rezultatov je potek dela natančno določen, kar vključuje fizično ločene prostore priprave reakcijskih mešanic in dodajanja vzorčne DNA ter ločene potrebščine (pipete, nastavki, rokavice in podobno) (Valentine-Thon, 2002).

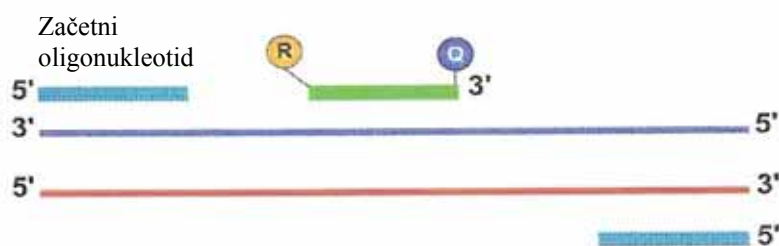
Lažno negativni rezultati so lahko posledica izgube vzorčne DNA zaradi postopka izolacije DNA, razgradnje vzorčne DNA kot posledice delovanja encimov (DNaze ali RNaze) ali inhibicije delovanja DNA Taq polimeraze (Valentine-Thon, 2002).

2.5.3 Virus Epstein-Barr

2.5.3.1 Mehanizem detekcije PCR pridelka s TaqMan sondami

Tako imenovane TaqMan sonde so hidrolizirajoče sonde, ki so dvojno označene s fluorofori. Na enem koncu s fluoroforom 6-FAM, na drugem s fluoroforom TAMRA. Fluorofor 6-FAM ne fluorescira, kadar je fluorofor TAMRA v neposredni bližini, saj to fluorescenco TAMRA absorbira. Na koncu vsake faze pomnoževanja DNA verige, sta sondi razgrajeni s strani DNA polimeraze z njeno 5'-endonukleazno aktivnostjo. S tem se FAM oddalji od fluorofora TAMRA, tako le-ta ne more več absorbirati fluorescence, ki jo FAM oddaja, in tako lahko FAM odda fluorescenco, kar zazna instrument. Tako se fluorescenca meri ob koncu vsake faze pomnoževanja posameznega cikla PCR (EBV R-geneTM..., 2005). Jakost fluorescence je sorazmerna količini DNA. TaqMan sonde oziroma hidrolizirajoče sonde so dolge od 18 do 22 baznih parov, njihova vsebnost gvanina in citozina pa bi naj bila med 30 in 80 odstotkov (PREMIER Biosoft International, 2005). Njihova temperatura tališča je za približno 10 °C višja od temperature tališča začetnih oligonukleotidov (Leutenegger, 2001).

Gen, ki se pomnožuje z začetnimi oligonukleotidi, ki so v reakcijski mešanici, je gen za timidin kinazo, BXLF1, dolg 169 baznih parov (EBV R-geneTM..., 2005). Slika 9 prikazuje shemo delovanja TaqMan sond za detekcijo PCR pridelka.

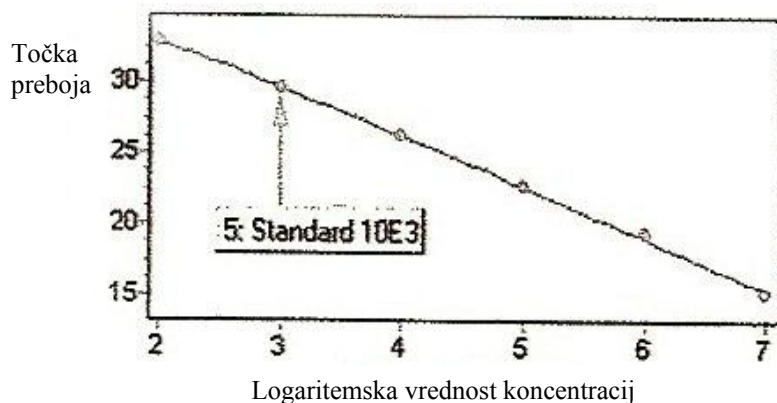


Slika 9: Shema delovanja TaqMan sond za detekcijo PCR pridelka (Povzeto po Premier Biosoft International, 2005)

2.5.3.2 Izdelava standardne krivulje za kvantifikacijo DNA EBV

Standardna krivulja se izdelava s štirimi standardi, ki so priloženi diagnostičnemu kompletu; koncentracije njihovih DNA so poznane. Koncentracija vzorčne DNA se določi z ekstrapolacijo na standardno krivuljo (EBV R-geneTM..., 2005). Slika 10 prikazuje primer

izrisane standardne krivulje, izdelane z različnimi redčitvami standarda. Točka preboja (Crossing point) je zaporedno število cikla PCR, pri katerem je detektor aparata LightCycler zaznal PCR pridelek.



Slika 10: Primer izrisane standardne krivulje, izdelane s standardi (LightCycler 2.0 Instrument..., 2003: 96)

2.5.3.3 Kontrola navzočnosti inhibitorjev

Kontrolo navzočnosti inhibitorjev izvajamo vzporedno s pomnoževanjem vzorčne DNA. Le-ta mora biti pomnoževana tako z amplifikacijsko kot inhibicijsko reakcijsko mešanico (EBV R-geneTM..., 2005).

2.5.3.4 Pomen pozitivne, negativne in inhibitorne kontrole

Po vsakem testiranju mora pozitivna kontrola dati pozitivne rezultate testa na EBV DNA, negativna negativne, inhibitorna kontrola pa služi za določitev začetne stopnje inhibicije DNA polimeraze (EBV R-geneTM..., 2005).

2.6 POMEN PCR ZA DIAGNOSTIKO OKUŽB S HERPESVIRUSI

2.6.1 Herpes simpleks in okužba centralnega živčnega sistema

Okužbe centralnega živčnega sistema z virusom HSV 1 ali HSV 2 so zelo resne, a na srečo redke, vendar njihovo število zadnja leta narašča, kar korelira s porastom števila bolnikov, ki imajo zmanjšan ali oslabljen imunski sistem (Linde in sod., 1997).

Preiskava likvorja je pomemben del diagnostike pri bolnikih, pri katerih se pojavi sum na okužbo centralnega živčnega sistema z virusom HSV 1 ali HSV 2. Visoka občutljivost metode PCR v realnem času nam omogoča detekcijo zelo nizkih koncentracij virusnega genoma v likvorju in tako dobiva prednost pred izolacijo virusa, elektronsko mikroskopijo, dokazovanjem virusnega antigena in tudi pred histološko preiskavo bioptičnega materiala. Opravljene študije pričajo o visoki občutljivosti in specifičnosti. Lažno negativni rezultati se lahko pojavljajo le zelo zgodaj ob začetku bolezni, ko je razmnoževanje virusa še zelo omejeno (Cinque in sod., 2003).

Tako se PCR v realnem času za dokazovanje DNA virusa HSV 1 v cerebrospinalni tekočini določa predvsem pri sumu na herpetični encefalitis in neonatalno okužbo, dokazovanje DNA virusa HSV 2 pa pri sumu na herpesni meningitis ali neonatalno okužbo (Cinque in sod., 2003).

2.6.1.1 Herpesni encefalitis

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času pomeni dandanes zlati standard v diagnostiki herpesnega encefalitisa. Znan je primer bolnika, ki so ga našli nezavestnega, vendar je samostojno dihal, njegov pulz je bil normalen, telesna temperatura je znašala 38,6 °C. Krvna slika je bila normalna, hemokultura in urinokultura negativna. Preiskava cerebrospinalne tekočine je kazala normalno sliko, barvanje po Gramu negativno, kultura negativna. Prejemal je antibiotično terapijo, vendar se stanje ni izboljšalo. Magnetna resonanca je šele po petih dnevih pokazala značilne znake, nekrotične lezije na sprednjem delu možganov, ki so bile podobne tistim pri herpesnem encefalitisu; PCR na HSV DNA je bil pozitiven. Po začetku terapije z aciklovirjem se je bolniku stanje postopno izboljševalo, vendar po odpustu iz bolnišnice še ni mogel govoriti (Razavi in Razavi, 2001).

Opisanih je še veliko podobnih primerov, ko običajna diagnostika (preiskava cerebrospinalne tekočine, magnetna resonanca ali računalniška tomografija) ni spoznala povzročitelja, PCR pa je dal pozitivne rezultate. Posledice herpesnega encefalitisa so zelo

močno odvisne od tega, kdaj bolnik prejme protivirusno terapijo, oziroma z drugimi besedami, kdaj postavimo pravilno diagnozo. DNA virusa HSV je možno s PCR zaznati že v prvem tednu, četudi bolnik prejema protivirusno terapijo. Kvantitativni PCR pa ima neprecenljivo vrednost pri spremljanju dinamike virusnega bremena in učinkovitosti protivirusne terapije. Pri pregledu z magnetno resonanco ali računalniško tomografijo nas lahko zavedejo različni tumorji, abscesi ali hematomi. Zaradi tega je prava diagnoza pozna prognoza pa slaba (Razavi in Razavi, 2001). Tako je PCR postal zlati standard pri diagnostiki herpesnega encefalitisa (Akhan in sod., 2001).

Znani so tudi primeri, pri katerih je bila klinična slika bolnika očitna, da gre za herpesni encefalitis, vendar je PCR dal negativne rezultate. Ob tako očitni klinični sliki (rezultati preiskave cerebrospinalne tekočine, preiskava z magnetno resonanco in elektroencefalogramom) navadno zdravnik prične s protivirusno terapijo (Akhan in sod., 2001).

2.6.1.2 Herpesni meningitis

Uporaba PCR v diagnostiki herpesnega meningitisa je močno izboljšala učinkovitost same diagnostike, saj pravilna in hitra diagnoza pomeni učinkovitejše zdravljenje, za bolnika pa vsekakor boljši izid (Cleator in Klapper, 2004).

2.6.2 Virus Epstein-Barr

Okužba z virusom EBV je veliko bolj pomembna pri bolnikih, ki imajo oslabilen imunski sistem kot pri imunsko normalno odzivnem posamezniku. Pri bolnikih z oslabilim imunskim sistemom lahko pride do zapletov, ki pri takih bolnikih lahko povzročijo celo smrt (Niesters, 2000). Pri ljudeh z normalnim imunskim odzivom imunski odziv premaga napredovanje virusne okužbe. Limfoproliferativne motnje po presaditvi organa ali krvnih celic so pogosti in hudi zapleti in so velikokrat povezani z virusom EBV (Yancoski in sod., 2004). Tako je presaditev organa najpogostejši vzrok za določevanje virusne DNA EBV pri prejemniku. Tako je zaplet zaradi okužbe z EBV še kako potrebno pravočasno preprečiti (Niesters, 2000), saj lahko hitra diagnostika in s tem pravočasno zdravljenje zmanjša smrtnost, ki lahko brez tega znaša tudi do 60 odstotkov (Yancoski in sod., 2004). Preglednica 7 kaže vzročno povezanost okužbe z EBV in presaditvijo organov ali krvnih celic. Vrednosti v oklepajih podajajo razpon dobljenih rezultatov (Niesters, 2000).

Preglednica 5: Povezava okužbe z EBV s presaditvijo organov ali krvnih celic (Niesters in sod., 2000: 714)

Skupina bolnikov	Delež pozitivnih (%)	Povprečno število kopij DNA EBV/ml krvi
Zdravi darovalci	0	<100
Bolniki po presaditvi organa	19,2	440 (100-12.000)
Bolniki z infekcijsko mononukleozo	72,7	6.400 (100-45.000)
Limfoproliferativne motnje po presaditvi organa	100	544.750 (74.000-3.200.000)

PCR v realnem času za dokazovanje DNA virusa EBV v likvorju uporabljamo pri sumu na meningitis ali encefalitis, povzročen zaradi okužbe centralnega živčnega sistema z EBV, pri imunsko oslabljenih bolnikih pa pri sumu na limfoproliferativne motnje pri prejemnikih organov ali pri sumu na limfome v centralnem živčnem sistemu (Cinque, 2003).

Kadar pa pri bolniku določamo virusno DNA v krvi, je pomembno, v kateri sestavini krvi ali v katerih krvnih celicah smo jo določali. Rezultati raziskav kažejo o dobrem ujemanju rezultatov dokazovanja DNA v krvi bolnika in dokazovanju DNA virusa v mononuklearnih celicah, medtem ko lahko PCR, s katerim dokazujemo virusno DNA v plazmi pri bolnikih z infekcijsko mononukleozo, daje lažno negativne rezultate, kar je lahko posledica izgube virusne DNA zaradi postopka ločevanja. Presenetljivo pa do tolikšnih odstopanj ne prihaja pri dokazovanju virusne DNA pri prejemnikih organov, kar nam je v veliko pomoč pri zgodnjem ugotavljanju limfoproliferativnih motenj po presaditvi organa ali krvnih celic (Fafi-Kremer in sod., 2004).

3 MATERIAL IN METODE DE LA

3.1 DOLOČANJE DNA VIRUSOV HERPESA SIMPLEKSA 1 IN 2

3.1.1 Vzorci

V raziskavo smo vključili 39 vzorcev. Od tega je bilo 15 vzorcev iz evropske kontrole, ki jih v laboratoriju sprejmejo enkrat letno kot zunanjo kontrolo. Preiskali smo 10 vzorcev iz leta 2003 in 5 iz leta 2004. Vsak vzorec iz evropske kontrole vsebuje točno določeno število kopij umetno sintetizirane DNA HSV 1 ali HSV 2. V preiskavo smo vključili tudi 24 likvorjev bolnikov s sumom na okužbo s HSV 1 ali HSV 2.

Iz vseh teh materialov so že izolirali DNA s kompletom QiAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Nemčija); vzorci so bili shranjeni pri -70 °C. Vsi vzorci so bili že preiskani s kompletom za kvantitativni PCR proizvajalca Artus, Nemčija.

3.1.2 Komora za pripravo reakcijske mešanice

Reakcijske mešanice smo pripravljali v komori Herolab (Herolab, GmbH, Nemčija). V komoro za pripravo reakcijske mešanice nismo vnašali DNA, da ne bi prišlo do kontaminacije reagentov.

3.1.3 Komora za dodajanje DNA

Druga komora Herolab (Herolab, GmbH, Nemčija) je služila za dodajanje DNA.

3.1.4 Aparatura za izvedbo PCR v realnem času

PCR je potekal na aparaturi LightCycler 2.0 Roche (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA). Slika 11 prikazuje aparaturo LightCycler 2.0 Roche.



Slika 11: Aparatura LightCycler 2.0 Roche (LightCycler 2.0 Instrument..., 2003: 98)

3.1.5 Pipete

Reagente in DNA smo pipetirali s kalibriranimi pipetami Eppendorf (Hamburg, Nemčija). Na pipetah smo uporabljali nastavke s filitrom, ki preprečujejo kontaminacijo konice pipete.

3.1.6 Diagnostični komplet za določitev DNA HSV 1/2 (Roche, Nemčija) sestava

V diagnostičnem kompletu so reagenti, ki so navedeni v preglednici 6.

Preglednica 6: Diagnostični komplet za kvalitativni PCR za virus HSV 1 in HSV 2 (Roche) (Kit for detection..., 2003: 3)

Oznaka reagenta	Ime reagenta	Volumen in funkcija
1a	LightCycler HSV 1/2 reakcijska mešanica a	<ul style="list-style-type: none">• 1 x 24 µl (a)• 4 x 35 µl (b)• 1 x 1 ml (c)
1b	LightCycler HSV 1/2 reakcijska mešanica b	<ul style="list-style-type: none">• Reakcijska mešanica je pripravljena za uporabo v ustreznem razmerju 1a, 1b in 1c• Vsebuje Taq DNA polimerazo, ki se aktivira pri visokih temperaturah, reakcijski pufer in mešanico dNTP-jev (dUTP namesto dTTP)
1c	LightCycler HSV 1/2 reakcijska mešanica c	
2	LightCycler HSV 1/2 detekcijska mešanica	<ul style="list-style-type: none">• 144 µl v 10-kratni koncentraciji• Začetni oligonukleotidi in sonde, specifični za HSV 1/2 in specifična interna kontrola• Občutljiv na svetlobo
3	LightCycler HSV 1/2 interna kontrola	<ul style="list-style-type: none">• 410 µl raztopine z za HSV 1/2 specifično interno kontrolo• Medprocesna kontrola za izolacijo DNA in detekcijo
4	LightCycler HSV 1/2 pozitivna kontrola DNA	<ul style="list-style-type: none">• 50 µl, vsebuje stabilno raztopino HSV 1/2 plazmidne DNA (približno 10³ kopij / 5µl)• Služi kot pozitivna kontrola
5	voda	<ul style="list-style-type: none">• 1 x 1 ml, ne vsebuje DNA, negativna kontrola

3.1.7 Priprava reakcijske mešanice za kvantitativni PCR

Reakcijsko mešanico smo pripravljali v posebnih kapilarah, narejenih za instrument LightCycler 2.0 (Roche), le-te pa predhodno postavili v hladilni blok, ki je med pripravo vzdrževal dovolj nizke temperature, da ne bi prišlo do predčasne medsebojne reakcije med reagenti. Hladilni blok je bil shranjen pri 4 °C. S pipeto smo za vsak posamezen vzorec v kapilarno dodajali reagente 1a, 1b in 1c, ki v ustreznem razmerju tvorijo mešanico (predhodno pripravili v epici) za potek PCR, detekcijsko mešanico ter notranjo kontrolo. Skupen volumen reakcijske mešanice je znašal 15,5 µl. Delo je potekalo v točno določenih komorah, na rokah smo imeli rokavice. Po pripravi reakcijske mešanice smo zamenjali rokavice in delovno komoro ter v kapilare dodali po 5 µl izolirane DNA, ki smo jo predhodno odtajali ter temeljito premešali.

Poleg kapilar, ki smo jih pripravili za kvantitativni PCR za izolirano DNA iz kliničnega materiala, smo morali vsakemu kvantitativnemu PCR, ki poteče, dodati še kapilarno za pozitivno in negativno kontrolo. Ti dve kapilari sta vsebovali enako reakcijsko mešanico kot testne, vendar sta imeli namesto izolirane DNA 5 µl raztopine HSV 1/2 plazmidne DNA - pozitivna kontrola ter 5 µl vode - negativna kontrola. Rezultati PCR so bili veljavni, če je bila pozitivna kontrola pozitivna, negativna kontrola pa negativna.

Tako pripravljene kapilare smo sproti zapirali s pokrovčki. Nato smo jih zapovrstjo prenesli v poseben nosilec, ki je del instrumenta LightCycler ter smo jih v tem nosilcu centrifugirali v centrifugi LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche, Nemčija) 15 sekund pri 3000 obratih/s. Nosilec s kapilarami smo nato vstavili v instrument LightCycler ter z vklopom aktivirali reakcijo, ki jo je usmerjal računalnik.

3.1.8 Pogoji PCR

Pogoje, pri katerih je potekal PCR, prikazuje preglednica 7.

Preglednica 7: Pogoji PCR (Kit for detection..., 2003: 12-3)

	Temperatura	Število ciklov	Čas
Denaturacija	95 °C	1	10 min
Pomnoževanje (v treh korakih)	95 °C, 55 °C, 72 °C	45	10 s, 15 s, 15 s
Analiza točke tališča	95 °C, 40 °C, 80 °C	1	0 s, 60 s, 0 s
Ohlajanje	40 °C	1	30 s

Pomnoževanje je zahtevalo tri različne temperature in pripadajoče inkubacijske čase. Pri temperaturi 95 °C je potekala denaturacija oziroma razklenitev dvojnovijačne DNA, pri 55 °C naleganje začetnih oligonukleotidov in pri 72 °C polimerizacija DNA. Analiza točke tališča je bila pomembna za genotipizacijo HSV. Za HSV 1 je določena temperatura tališča pri 54,0 °C ± 2,5 °C, za HSV 2 pa 66,5 °C ± 2,5 °C.

3.1.9 Izdelava standardne krivulje

Ko smo ugotovili, da je diagnostični komplet za virus herpes simpleks 1 ali 2 (Roche), le kvalitativen in ne kvantitativen, smo se odločili, da z vzorci evropske kontrole poskušamo reakcijo kvantificirati. Za izdelavo standardne krivulje, ki je osnova za kvantifikacijo virusne DNA, smo namesto standardov z znanimi koncentracijami, ki so kvantitativnim diagnostičnim kompletom priloženi, uporabili omenjene vzorce, za katere smo poznali natančne koncentracije.

3.1.10 Analiza rezultatov

Pogoji, ki jim moramo zadostiti, da so rezultati po končanem PCR veljavni, so:

- Pozitivna kontrola mora biti pozitivna
- Negativna kontrola mora biti negativna
- Analiza interne kontrole – interna kontrola mora biti pozitivna. Če je negativna, pomeni, da so v vzorcu inhibitorji PCR.

Če je vzorec pozitiven, interna kontrola pa negativna, to ne pomeni, da so navzoči inhibitorji, temveč lahko pride do tega, da je vzorčna DNA v prebitku v primerjavi z interno kontrolo in se le-ta ne pomnožuje. Pomnoževanje interne kontrole smo detektirali z vzbujanjem fluorofora na sondi pri svetlobi valovne dolžine 705nm.

Če smo zadostili zgornjim zahtevam, s standardno krivuljo za kvantifikacijo in s krivuljo temperature tališča za genotipizacijo, ugotovimo število kopij genoma HSV na mililiter vzorca in določimo enega od obeh virusov.

3.1.11 Predstavitve rezultatov

Rezultate smo zaradi boljše preglednosti na grafu predstavili z logaritetskimi vrednostmi koncentracij.

3.2 VIRUS EPSTEIN-BARR

3.2.1 Vzorci

Za delo smo uporabili 37 vzorcev. Petnajst vzorcev je bilo iz zunanje evropske kontrole - 7 iz leta 2003, 8 pa iz leta 2005. Drugih 22 vzorcev so bili klinični materiali bolnikov: bris žrela, kri, plazma, serum, polimorfonuklearne celice ter kostni mozeg.

DNA EBV iz vseh naštetih vzorcev je že bila izolirana s kompletom QiAamp®DNA Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Nemčija). Izolirana DNA je bila shranjena pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vsi vzorci so že bili testirani s kompletom za kvantitavni PCR proizvajalca Artus in Roche; mi smo jih preiskali še s kompletom Argene, Francija.

Za izvedbo PCR smo uporabljali vso opremo, ki je opisana pod točkami 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 in 3.1.5.

3.2.2 Diagnostični komplet za določitev DNA virusa Epstein-Barr (Argene, Francija) sestava

V navodilih diagnostičnega kompleta za kvantifikacijo EBV je proizvajalec navedel, da je komplet najprimernejši za določevanje DNA virusa EBV v krvi. Mi smo komplet uporabili tudi pri drugih kliničnih materialih. Reagenti kompleta so navedeni v preglednici 8.

Preglednica 8: Diagnostični komplet za določitev DNA virusa EBV (Argene, Francija) (EBV R-gene™..., 2005: 3)

Reagent	Volumen	Funkcija
Kvantifikacijski standard 1	150 μl	<ul style="list-style-type: none">Koncentracija = 10.000 kopij/μl oz. 5×10^6 EBV/ml krvi
Kvantifikacijski standard 2	150 μl	<ul style="list-style-type: none">Koncentracija = 1.000 kopij/μl oz. 5×10^5 EBV/ml krvi
Kvantifikacijski standard 3	150 μl	<ul style="list-style-type: none">Koncentracija = 100 kopij/μl oz. 5×10^4 EBV/ml krvi
Kvantifikacijski standard 4	150 μl	<ul style="list-style-type: none">Koncentracija = 10 kopij/μl oz. 5×10^3 EBV/ml krvi
Občutljivostna kontrola	150 μl	<ul style="list-style-type: none">Koncentracija = 1 kopija/μl oz. 500 kopij EBV/ml krvi

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednica št. 8: Diagnostični komplet za določitev DNA virusa EBV (Argene, Francija) (EBV R-gene™..., 2005: 3)

Reagent	Volumen	Funkcija
Amplifikacijska mešanica	3 x 0,450 ml	<ul style="list-style-type: none">• Vsebuje za EBV specifične začetne oligonukleotide in sonde
Kontrolna inhibicijska mešanica	2 x 0,450 ml	<ul style="list-style-type: none">• Vsebuje začetne oligonukleotide in sonde, specifične za kontrolo inhibicije reakcije
Voda	0,3 ml	<ul style="list-style-type: none">• Služi kot negativna kontrola

3.2.3 Priprava reakcijske mešanice za kvantitativni PCR

Priprava reakcijske mešanice je potekala v steklenih kapilarah, ki so bile nameščene v poseben hladilen blok, ki je med samo pripravo vzdrževal temperaturo 4 °C, kar je preprečilo prehitro reagiranje reagentov med seboj.

Test za vsak vzorec je potekal v dveh paralelkah. Izolirano DNA vsakega posameznega vzorca smo dodali v dve kapilari, in sicer k amplifikacijski in kontrolni inhibicijski mešanici, ki smo ju vsake odpipetirali v kapilare po 15 µl; temu smo dodali 10 µl izolirane predhodno odtajene DNA.

Vsak test poleg dveh paralelk za vsak vzorec, ki smo ga testirali, je vseboval še tri kontrolne kapilare: za negativno kontrolo, pozitivno oziroma občutljivostno kontrolo in inhibicijsko kontrolo ter še eno kapilaro, v kateri je bil kvantifikacijski standard 3.

V kapilaro za negativno kontrolo smo dali amplifikacijsko mešanico in vodo.

V kapilaro za občutljivostno kontrolo smo dali amplifikacijsko mešanico in občutljivostno kontrolo (500 kopij/ml)

V kapilaro za inhibicijsko kontrolo smo dali inhibicijsko mešanico in vodo.

Kvantifikacijski standard 3 omogoča prenos standardne krivulje.

Vse reagente smo pred uporabo odtajali, vorteksirali in centrifugirali.

3.2.4 Pogoji PCR

PCR je potekal pri pogojih, navedenih v preglednici 9.

Preglednica 9: Pogoji kvantitativnega PCR za dokaz DNA EBV (EBV R-gene™..., 2005: 14)

Proces	Temperatura	Število ciklov	Čas
Aktivacija	95 °C	1	15 min
Amplifikacija	95 °C, 60 °C	45	10 s, 40 s
Ohlajanje	40 °C	1	30 s

V procesu amplifikacije pride pri temperaturi 95 °C do razklenitve dvojnovijačne DNA, pri 60 °C pa do naleganja začetnih oligonukleotidov in pomnoževanja.

3.2.5 Izdelava standardne krivulje

Standardno krivuljo smo izdelali s standardi, ki so v diagnostičnem kompletu. Imajo točno določeno koncentracijo, ki predstavljajo določene točke na premici.

Standardna krivulja je tem boljša in zanesljivejša, če je vrednost učinkovitosti blizu vrednosti 2; tedaj je standardna napaka tem manjša.

3.2.6 Analiza rezultatov

Po končanem PCR je potrebno rezultate ovrednotiti. Rezultati so bili veljavni, če smo imeli znane naslednje podatke:

- Zaporedno število cikla, pri katerem je instrument zaznal zadostno količino DNA za detekcijo fluorescence – točka preboja mora biti med 28 in 32 (angl. Crossing point).
- Zaporedno število cikla, pri katerem je instrument zaznal zadostno količino DNA za detekcijo fluorescence inhibicijske kontrole mora biti manj od 36.
- Občutljivostna kontrola mora biti pozitivna.
- Negativna kontrola mora biti negativna.

Po zadostitvi vsem štirim pogojem je sledila kvantifikacija DNA virusa EBV glede na standardno krivuljo. Rezultat izrazimo s številom kopij genoma na mililiter vzorca.

4 REZULTATI

4.1 VIRUS HERPES SIMPLEKS 1 IN 2

4.1.1 Primerjava rezultatov zunanje evropske kontrole in rezultatov, dobljenih s kompletoma Artus in Roche

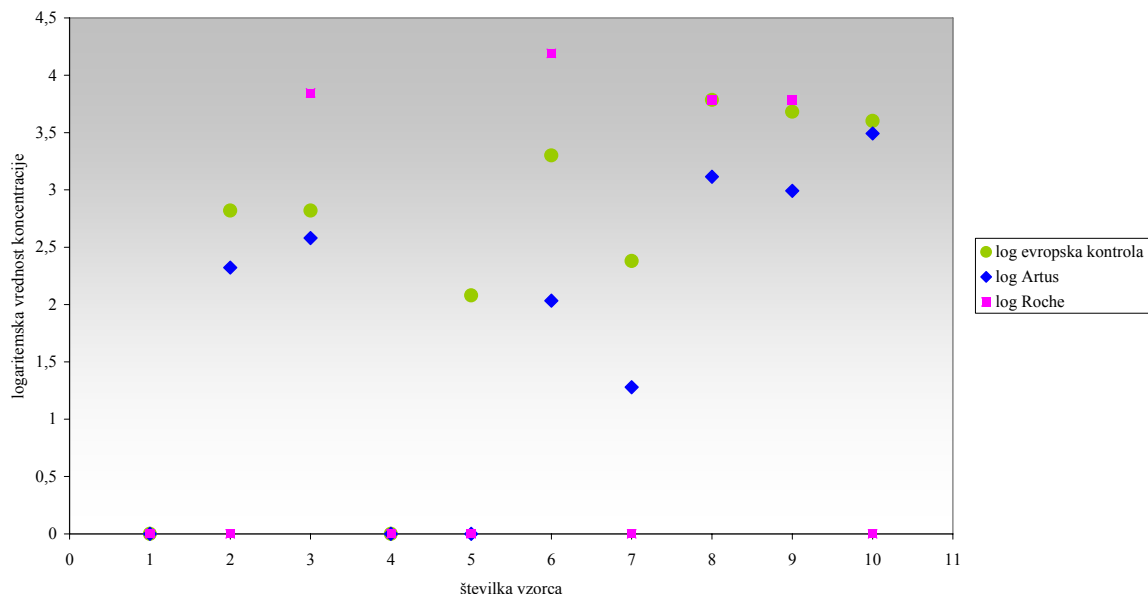
Rezultate zunanje evropske kontrole 2003 in rezultate, dobljene s kompletoma Artus in Roche, prikazuje preglednica 10.

Preglednica 10: Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole 2003 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche

Št. vzorca	Evropska kontrola			Artus			Roche		
	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem konc.	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem konc.	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem konc.
1	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.
2	HSV1	$6,6 \times 10^2$	2,82	HSV1	$2,1 \times 10^2$	2,32	Neg.	0	Ni def.
3	HSV1	$6,6 \times 10^2$	2,82	HSV1	$3,8 \times 10^3$	3,58	HSV1	7×10^3	3,84
4	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.
5	VZV	$1,2 \times 10^2$	2,08	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.
6	HSV2	$2,0 \times 10^3$	3,30	HSV2	$1,08 \times 10^2$	2,03	HSV2	$1,55 \times 10^4$	4,19
7	HSV2	$2,4 \times 10^2$	2,38	HSV2	$1,9 \times 10^1$	1,28	Neg.	0	Ni def.
8	HSV1	$6,1 \times 10^3$	3,79	HSV1	$1,3 \times 10^3$	3,11	HSV2	$6,1 \times 10^3$	3,79
9	HSV2	$4,8 \times 10^3$	3,68	HSV2	$9,8 \times 10^2$	2,99	HSV2	$6,1 \times 10^3$	3,79
10	HSV1	$4,0 \times 10^3$	3,60	HSV1	$3,1 \times 10^3$	3,49	Neg.	0	Ni def.

Ni def.=logaritemska vrednost števila nič ni definirana

Grafični prikaz preglednice 10 je na sliki 12.



Slika 12: Grafični prikaz logaritmskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma HSV na mililiter vzorcev zunanje evropske kontrole 2003 in rezultatov testiranja istih vzorcev, dobljenih z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche

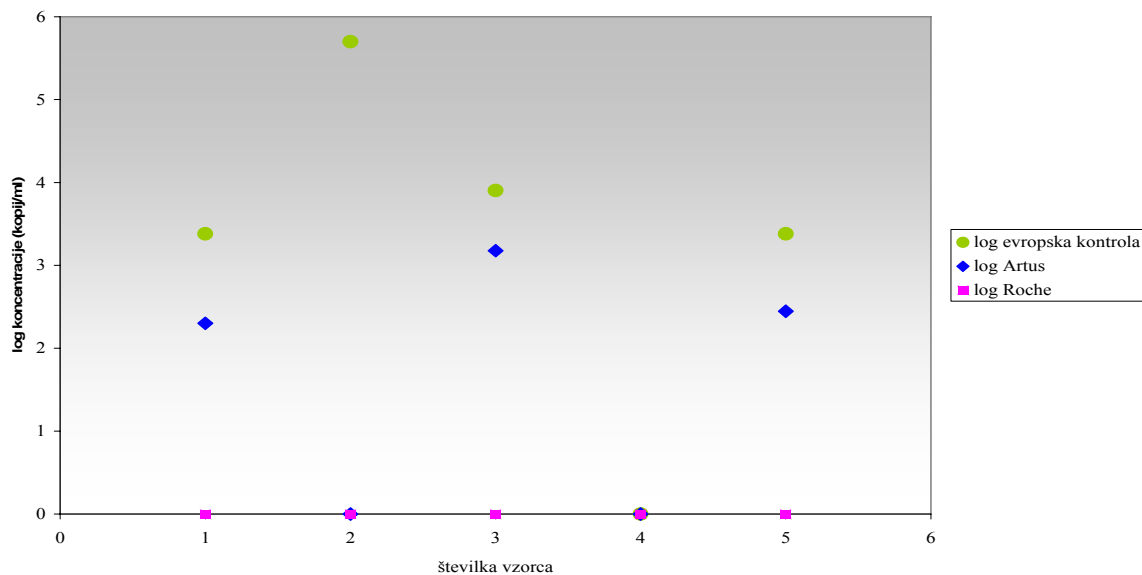
Rezultate testiranja vzorcev zunanje evropske kontrole 2004 in rezultate testiranja istih vzorcev, dobljene s kompletoma Artus in Roche, prikazuje preglednica 11.

Preglednica 11: Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole 2004 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnim kompletom Artus in Roche

Št. vzorca	Evropska kontrola			Artus			Roche		
	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem konc.	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem konc.	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem konc.
1	HSV1	$2,4 \times 10^3$	3,38	HSV1	$2,0 \times 10^2$	2,30	Neg.	0	Ni def.
2	VZV	$5,0 \times 10^5$	5,70	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.
3	HSV1	$8,0 \times 10^3$	3,90	HSV1	$1,5 \times 10^3$	3,18	Neg.	0	Ni def.
4	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.
5	HSV1	$2,4 \times 10^3$	3,38	HSV1	$2,8 \times 10^2$	2,44	Neg.	0	Ni def.

Ni def.=logaritemska vrednost števila nič ni definirana

Grafični prikaz rezultatov iz preglednice 11 je na sliki 13.



Slika 13: Grafični prikaz logaritamskih vredosti koncentracij v kopijah genoma HSV na mililiter vzorcev zunanje evropske kontrole 2004 in rezultatov testiranj istih vzorcev, dobljenih s kompletoma Artus in Roche

4.1.2 Primerjava rezultatov testiranj likvorjev dobljenih z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche

Rezultate testiranja likvorjev, dobljene z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche prikazuje preglednica 12.

Preglednica 12: Rezultati testiranja likvorjev, dobljeni z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche

Št. vzorca	Artus			Roche		
	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem koncentracije	DNA	Koncentracija (kopij/ml)	Logaritem koncentracije
1	HSV 1	$9,10 \times 10^5$	5,96	HSV 1	$2,21 \times 10^6$	6,34
2	HSV 1	$1,00 \times 10^4$	4,00	Neg.	0	Ni def.
3	HSV 1	$1,85 \times 10^2$	2,27	Neg.	0	Ni def.
4	HSV 1	$5,23 \times 10^2$	2,72	Neg.	0	Ni def.
5	HSV 1	$6,05 \times 10^7$	7,78	HSV 1	$3,47 \times 10^8$	8,54
6	HSV 2	$3,70 \times 10^4$	4,57	HSV 2	$4,61 \times 10^4$	4,66
7	HSV 1	$2,36 \times 10^2$	2,37	Neg.	0	Ni def.
8	HSV 2	$6,00 \times 10^2$	2,78	Neg.	0	Ni def.
9	HSV 1	$1,04 \times 10^2$	2,02	Neg.	0	Ni def.
10	HSV 2	$4,88 \times 10^2$	2,69	Neg.	0	Ni def.
11	HSV 2	$1,26 \times 10^3$	3,10	Neg.	0	Ni def.
12	HSV 1	$4,03 \times 10^3$	3,61	HSV 1	$1,08 \times 10^5$	5,03
13	HSV 1	$2,78 \times 10^3$	3,44	Neg.	0	Ni def.

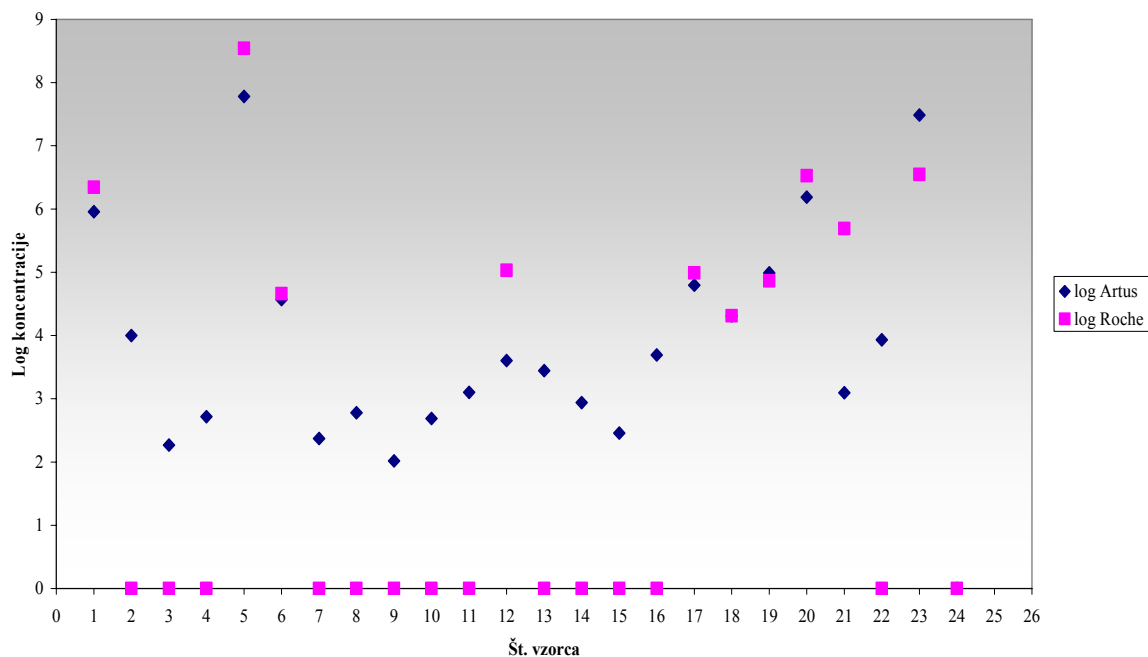
(nadaljevanje)

Nadaljevanje preglednica št. 12: Rezultati testiranja likvorjev, dobljeni z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche

Št. vzorca	Artus			Roche		
	DNA	Koncentracija kopij/ml	Logaritem koncentracije	DNA	Koncentracija (kopij/ml)	Logaritem koncentracije
14	HSV 2	$8,70 \times 10^2$	2,94	Neg.	0	Ni def.
15	HSV 1	$2,86 \times 10^2$	2,46	Neg.	0	Ni def.
16	HSV 1	$4,92 \times 10^3$	3,69	Neg.	0	Ni def.
17	HSV 1	$6,25 \times 10^4$	4,80	HSV 1	$9,76 \times 10^4$	4,99
18	HSV 1	$2,04 \times 10^4$	4,31	HSV 1	$2,06 \times 10^4$	4,31
19	HSV 1	$9,76 \times 10^4$	4,99	HSV 1	$7,29 \times 10^4$	4,86
20	HSV 2	$1,55 \times 10^6$	6,20	HSV 2	$3,38 \times 10^6$	6,53
21	HSV 1	$1,25 \times 10^3$	3,10	HSV 1	$4,91 \times 10^5$	5,69
22	HSV 1	$8,58 \times 10^3$	3,93	Neg.	0	Ni def.
23	HSV 1	$3,06 \times 10^7$	7,49	HSV 1	$3,55 \times 10^6$	6,55
24	Neg.	0	Ni def.	Neg.	0	Ni def.

Ni def.=logaritemska vrednost števila nič ni definirana

Grafičen prikaz rezultatov iz preglednice 12 je na sliki 14.



Slika 14: Grafični prikaz logaritmskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma HSV na mililiter likvorja, dobljenih z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche

4.2 VIRUS EPSTEIN-BARR

4.2.1 Primerjava rezultatov testiranja vzorcev zunanje evropske kontrole in rezultatov testiranja istih vzorcev, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

Rezultati testiranja vzorcev zunanje evropske kontrole 2003 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene, so predstavljeni v preglednici 13.

Preglednica 13: Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole iz leta 2003 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

Št. vz.	Evropska kontrola		Artus		Roche		Argene	
	Koncentracija kopij/ml	Log konc.	Koncentracija kopij/ml	Log konc.	Koncentracija kopij/ml	Log konc.	Koncentracija kopij/ml	Log konc.
1	1000	3,00	2992,5	3,48	17175	4,23	3,22x10 ³	3,51
2	0	Ni def.	0	Ni def.	0	Ni def.	0	Ni def.
3	2500	3,40	343	2,54	5265	3,72	3,08x10 ³	3,49
4	5000	3,70	681,9	2,83	6300	3,80	1,16x10 ³	3,06
5	1000	3,00	153,9	2,19	4657,5	3,67	1,14x10 ²	2,06
6	0	Ni def.	0	Ni def.	0	Ni def.	0	Ni def.
7	250	2,40	53	1,72	2632,5	3,42	1,71x10 ²	2,23

Ni def.=logaritemska vrednost števila nič ni definirana

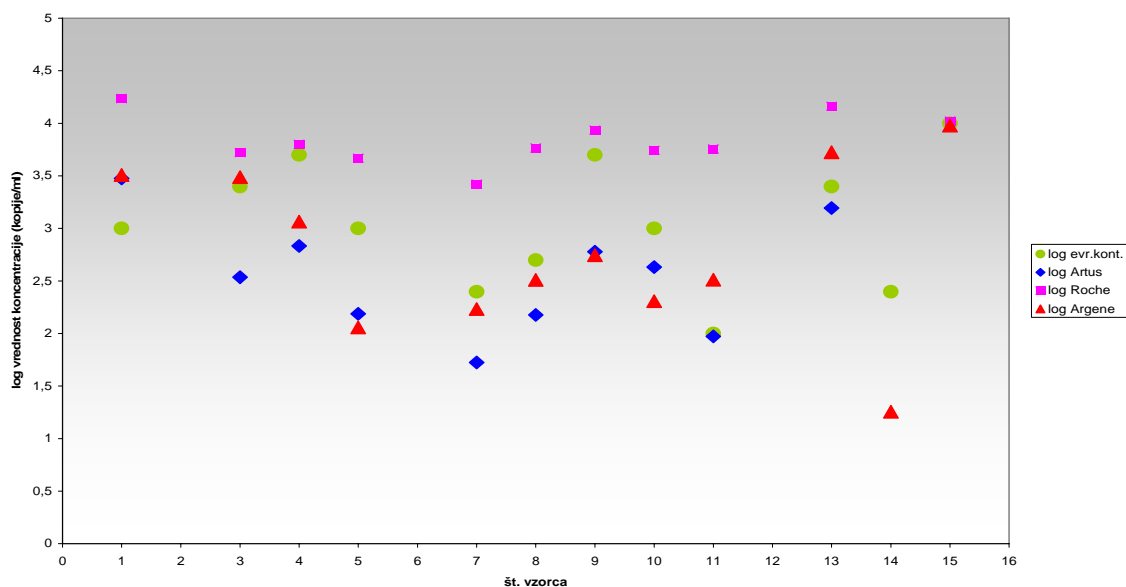
Rezultati testiranja vzorcev zunanje evropske kontrole 2005 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene, so predstavljeni v preglednici 14.

Preglednica 14: Koncentracije vzorcev zunanje evropske kontrole iz leta 2005 in rezultati testiranja istih vzorcev, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

Št. vz.	Evropska kontrola		Artus		Roche		Argene	
	Koncentracija kopij/ml	Log konc.	Koncentracija kopij/ml	Log konc.	Koncentracija kopij/ml	Log konc.	Koncentracija kopij/ml	Log konc.
8	5×10^2	2,70	150	2,18	$5,825 \times 10^3$	3,77	$3,24 \times 10^2$	2,51
9	5×10^3	3,70	600	2,78	$8,612 \times 10^3$	3,91	$5,57 \times 10^2$	2,74
10	1×10^3	3,00	429	2,63	$5,537 \times 10^3$	3,74	$2,03 \times 10^2$	2,31
11	1×10^2	2,00	94	1,97	$5,7 \times 10^3$	3,76	$3,25 \times 10^2$	2,51
12	0	Ni def.	0	Ni def.	0	Ni def.	0	Ni def.
13	$2,5 \times 10^3$	3,40	1563	3,19	$1,45 \times 10^4$	4,16	$5,3 \times 10^3$	3,72
14	$2,5 \times 10^2$	2,40	0	Ni def.	0	Ni def.	18	1,26
15	1×10^4	4,00	$5,52 \times 10^6$	6,74	$1,0475 \times 10^4$	4,02	$9,52 \times 10^3$	3,98

Ni def.=logaritemska vrednost števila nič ni definirana

Grafični prikaz rezultatov iz preglednice 13 in 14 je na sliki 15. Koncentracije dobljene s kompletom Artus za vzorec številka 15 ni na sliki zaradi prevelikega odstopanja od ostalih vrednosti.



Slika 15: Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah genoma EBVna mililiter vzorcev zunanje evropske kontrole iz leta 2003 in 2005 ter rezultatov testiranja istih vzorcev, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

4.2.2 Primerjava rezultatov določanja koncentracij DNA EBV v kliničnem materialu, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

Rezultati koncentracij v kliničnem materialu v kopijah na mililiter dobljenimi s kompleti Artus, Roche in Argene so predstavljeni v preglednici 15.

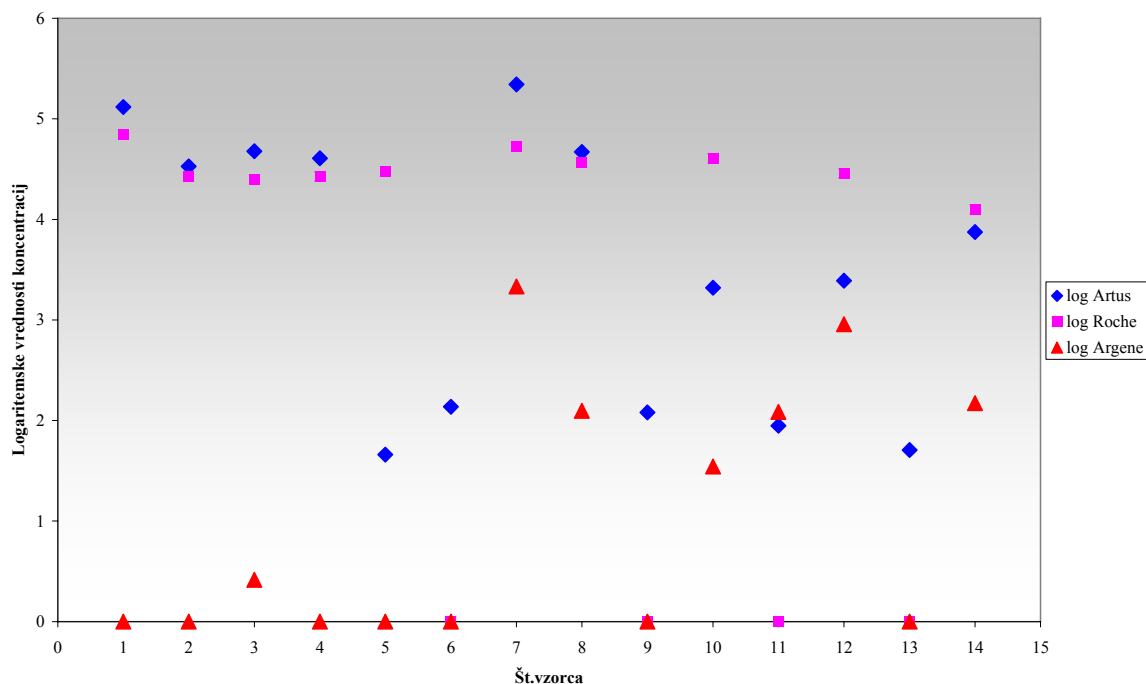
Preglednica 15: Rezultati PCR prikazani kot koncentracije DNA EBV na mililiter v kliničnem materialu, dobljeni z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

Št vzorca	Vrsta kliničnega materiala	Artus		Roche		Argene	
		Konc. kopij/ml	Log konc.	Konc. kopij/ml	Log konc.	Konc. kopij/ml	Log konc.
1	Bris žrela	1,31x10 ⁵	5,12	6,99x10 ⁴	4,84	0	Ni def.
2	PMNC	3,37x10 ⁴	4,53	2,67x10 ⁴	4,43	0	Ni def.
3	PMNC	4,76x10 ⁴	4,68	2,5x10 ⁴	4,40	2,6	0,41
4	PMNC	4,05x10 ⁴	4,61	2,68x10 ⁴	4,43	0	Ni def.
5	Plazma	45,8	1,66	3x10 ⁴	4,47	0	Ni def.
6	Plazma	137	2,14	0	Ni def.	0	Ni def.
7	Serum	2,2x10 ⁵	5,34	5,29x10 ⁴	4,72	2,15x10 ³	3,33
8	Serum	4,68x10 ⁴	4,67	3,68x10 ⁴	4,57	1,25x10 ²	2,10
9	Plazma	120	2,08	0	Ni def.	0	Ni def.
10	Plazma	2,09x10 ³	3,32	4,06x10 ⁴	4,61	34,9	1,54
11	Serum	89	1,95	0	Ni def.	1,22x10 ²	2,09
12	Serum	2,46x10 ³	3,39	2,87x10 ⁴	4,46	9,1x10 ²	2,96
13	Serum	51	1,71	0	Ni def.	0	Ni def.
14	Kostni mozeg	7,5x10 ³	3,88	1,255x10 ⁴	4,10	1,49x10 ²	2,17

PMNC = polimorfonuklearne celice

Ni def.=logaritemska vrednost števila nič ni definirana

Grafični prikaz rezultatov iz preglednice 15 je na sliki 16.

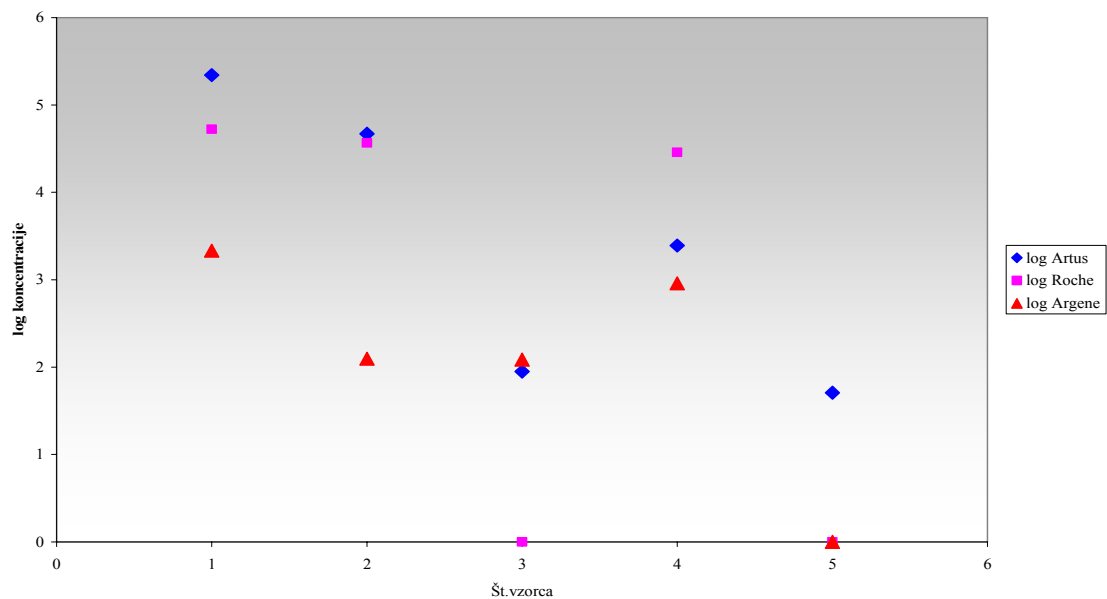


Slika 16: Grafični prikaz logaritmskih vrednosti koncentracij genoma EBV na mililiter v kliničnih materialih, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

4.2.3 Primerjava rezultatov ugotavljanja števila kopij genoma EBV na mililiter vzorca glede na vrsto kliničnega materiala, dobljenih z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

4.2.3.1 Primerjava rezultatov koncentracij DNA EBV v serumu

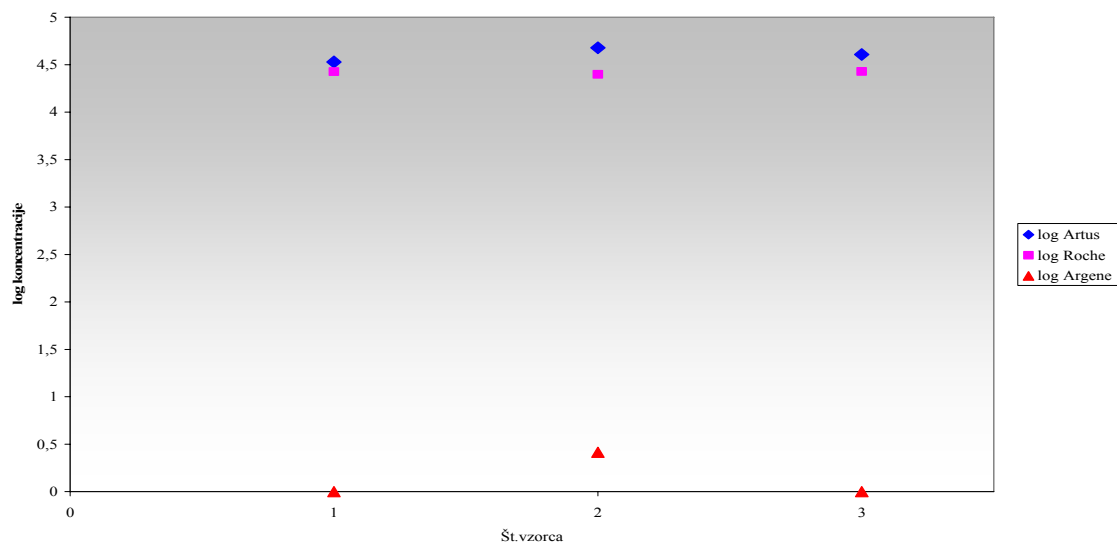
Slika 17 grafično prikazuje koncentracije kopij genoma EBV v mililitru seruma. Rezultati so dobljeni s kompleti Artus, Roche in Argene.



Slika 17: Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah DNA EBV na mililiter seruma, dobljenimi s kompleti Artus, Roche in Argene

4.2.3.2 Primerjava rezultatov koncentracij DNA EBV v polimorfonuklearnih celicah

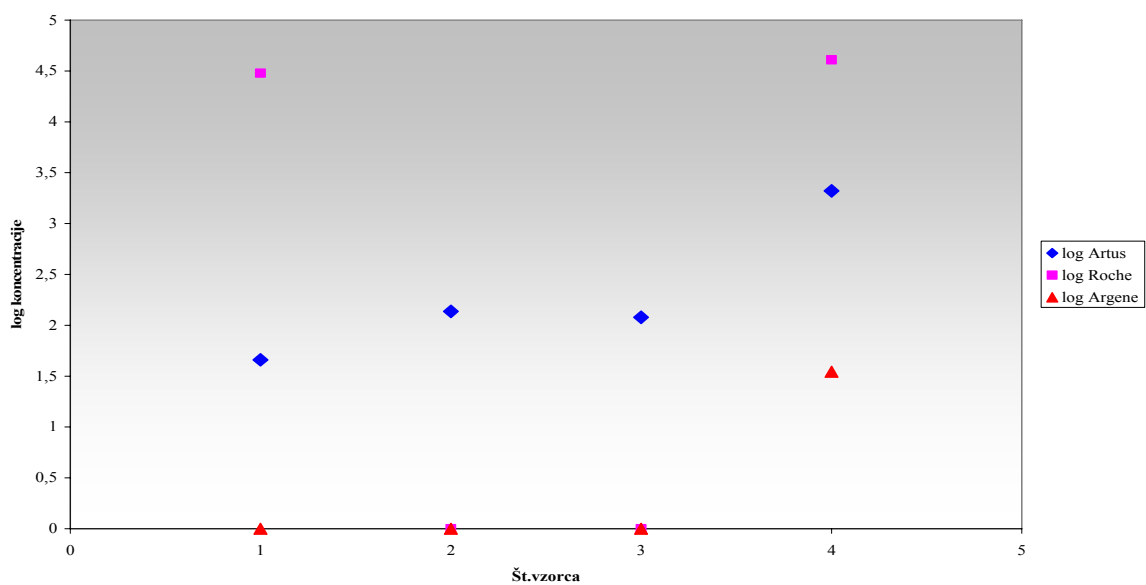
Slika 18 grafično prikazuje koncentracije kopij genoma EBV v polimorfonuklearnih celicah. Rezultati so dobljeni s kompleti Artus, Roche in Argene.



Slika 18: Grafični prikaz logaritemskih vrednosti koncentracij v kopijah DNA EBV na mililiter polimorfonuklearnih celic, dobljenimi z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

4.2.3.3 Primerjava rezultatov koncentracij DNA EBV v plazmi

Slika 19 grafično prikazuje koncentracije EBV genoma v mililitru plazme. Rezultati so dobljeni s kompleti Artus, Roche in Argene.



Slika 19: Grafični prikaz logaritamskih vrednosti koncentracij v kopijah DNA EBV na mililiter plazme, dobljenimi z diagnostičnimi kompleti Artus, Roche in Argene

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Kvantitativne in hitrejše metode za dokazovanje nukleinskih kislin, ki jih izvajamo s komercialno dostopnimi reagenti, so v večini diagnostičnih laboratorijev zamenjale starejši »in house« PCR. Na tržišču je mnogo diagnostičnih kompletov različnih proizvajalcev. Ob predstavitvi nam vsak posebej zagotavlja, da je njihov diagnostičen komplet najboljši, najzanesljivejši in najhitrejši med ponujenimi ter da izpolnjuje vse značilnosti in prednosti, ki so v diagnostiki pomembne in potrebne. To so ponovljivost in zanesljivost rezultatov, visoka občutljivost in specifičnost, minimalna možnost lažno negativnih ali lažno pozitivnih rezultatov ter zmožnost določitve minimalnega števila kopij genoma v preiskovanem kliničnem materialu. V naši raziskavi smo preizkusili več različnih diagnostičnih kompletov na istih kliničnih materialih. Pričakovali smo primerljive rezultate, vendar se to v vseh primerih ni izkazalo. Kriterij ujemanja dveh rezultatov omejuje razdalja logaritemske vrednosti enega eksponenta na grafikonu logaritmskih vrednosti koncentracij.

5.1.1 Primerjava rezultatov preiskav vzorcev na DNA virusov herpesa simpleksa 1 in 2

Vzorci, poslani iz zunanje evropske kontrole in likvorje bolnikov s sumom na herpesni encefalitis, smo preiskali z diagnostičnima kompletoma proizvajalcev Artus in Roche.

Rezultati, dobljeni z diagnostičnim kompletom Artus, se z rezultati zunanje evropske kontrole ujemajo v 67 odstotkih (10 od 15). V 23 odstotkih se ne ujemajo - v povprečju za en eksponent. Z diagnostičnim kompletom Artus smo določili nižje koncentracije genoma; lažno negativnih rezultatov nismo dobili. Komplet Artus ima občutljivostno mejo pod 500 kopij DNA HSV v vzorcu. Najnižja določena koncentracija genoma HSV v vzorcu s kompletom Artus je bila 19 kopij na mililiter vzorca. Rezultati genotipizacije vzorcev iz zunanje evropske kontrole, pridobljeni s kompletom Artus, se v 100 odstotkih ujemajo z rezultati, ki so jih sporočili iz zunanje evropske kontrole. Genotipizacija je potekala brez težav, krivulje temperature tališča so bile zelo značilne za enega od obeh HSV.

Navzkrižno reaktivnost reagentov kompleta z drugimi herpesvirusi smo lahko ovrgli, ker smo ocenili vzorec iz zunanje evropske kontrole, ki je vseboval DNA virusa varicella zoster (VZV), kot negativen.

Rezultati, dobljeni z diagnostičnim kompletom Roche, so se z rezultati iz zunanje evropske kontrole ujemali le v 33 odstotkih (5 od 15). Dobili smo kar 6 lažno negativnih rezultatov, kar znaša 40 odstotkov vzorcev. Ta podatek lahko pripišemo visoki mejni vrednosti diagnostičnega kompleta Roche, saj so vsi vzorci, ki jih je komplet Roche prepoznal kot negativne, vsebovali do 10.000 kopij genoma HSV na mililiter ali nekaj več. Tako je občutljivostna meja kompleta Roche okoli 10.000 kopij genoma na mililiter.

Rezultati genotipizacije s kompletom Roche se z rezultati zunanje evropske kontrole ujemajo pri vseh »pozitivnih« vzorcih, razen pri enem (številka osem). Z diagnostičnim kompletom Artus smo določili, da je v vzorcu DNA HSV 1, s kompletom Roche, da je v vzorcu DNA HSV 2. Napako pri genotipizaciji pri tem vzorcu lahko morda pripišemo nizki koncentraciji DNA v vzorcu (6.100 kopij na mililiter), saj lahko nizka koncentracija kopij genoma v vzorcu zmanjša specifičnost reakcije.

V vzorcih, ki je vseboval DNA virusa varicella zoster (VZV), ni prišlo do pomnoževanja genoma. S tem smo potrdili, da diagnostični komplet Roche zagotavlja specifičnost rezultatov.

Rezultati določanja koncentracij DNA HSV v vzorcih iz zunanje evropske kontrole, dobljeni s kompletoma Artus in Roche, se med seboj ujemajo le v sedmih (od petnajstih) vzorcih; od tega je bil pri petih vzorcih negativen rezultat določen z obema diagnostičnima kompletoma.

Z diagnostičnima kompletoma Artus in Roche smo preiskali likvorje bolnikov s sumom na herpesni encefalitis. Rezultati potrjujejo postavljene meje občutljivosti. S kompletom Artus smo dobili pozitivne rezultate tudi pri vzorcih, ki so vsebovali nekaj 100 kopij genoma HSV na mililiter, s kompletom Roche pa smo dobili pozitivne rezultate pri vzorcih, ki so vsebovali povprečno nad 10.000 kopij genoma HSV na mililiter. Pri vzorcih, ki so vsebovali nad 10.000 kopij genoma na mililiter, rezultati obeh kompletov ne odstopajo veliko drug od drugega; če pa, je to bilo največ za en eksponent (pri dveh vzorcih). Nad vrednostjo 1.000.000 kopij genoma na mililiter, se rezultati razlikujejo zanemarljivo, ujemanje rezultatov je praktično 100 odstotno.

5.1.2 Primerjava rezultatov preiskave vzorcev na DNA EBV

Vzorci iz zunanje evropske kontrole in klinične vzorce smo preiskali z diagnostičnimi kompleti proizvajalcev Artus, Roche in Argene.

Rezultati, dobljeni z diagnostičnim kompletom Artus, se z rezultati, ki smo jih dobili iz zunanje evropske kontrole, ujemajo v 80 odstotkih (12 od 15). Pri kvantitativnem ocenjevanju smo s kompletom Artus dobili pri vseh vzorcih, z izjemo enega, nižje koncentracije genoma. Dobili smo tudi en lažno negativen rezultat (vzorec številka 14), kar je verjetno posledica dokaj nizke koncentracije DNA v vzorcu (250 kopij/ml); sicer smo s kompletom Artus uspešno pomnoževali vzorce, ki so imeli še manjšo koncentracijo genoma. Občutljivostno mejo lahko za komplet Artus ocenimo na manj kot 500 kopij genoma EBV na mililiter. Dejanske vrednosti koncentracij v vzorcu so bile okoli 1000 kopij DNA EBV na mililiter. O podobnih rezultatih poroča tudi Ruiz (Ruiz on sod., 2005). Iz štirih različnih laboratorijev, ki so določevali DNA v vzorcih zunanje evropske kontrole s kompletom Artus, ni niti eden pravilno pozitivno ovrednotil vzorcev, ki so vsebovali od 100 do 500 kopij DNA na mililiter (Ruiz in sod., 2005).

Rezultati, dobljeni z diagnostičnim kompletom Roche, se z rezultati zunanje evropske kontrole ujemajo v 67 odstotkih (10 od 15). Za razliko od kompleta Artus, ima komplet Roche pri vseh vzorcih nižji prag občutljivosti; v primerjavi s kompletom Artus določa višje koncentracije genoma v vzorcu. Podobno je Ruiz v svoji raziskavi ugotovil, da s kompletom Roche v primerjavi s kompletom Artus dobimo v povprečju petkrat višje vrednosti koncentracij (Ruiz in sod., 2005).

Mejo občutljivosti kompleta Artus smo ocenili na manj kot 1000 kopij genoma EBV na mililiter. Lažno negativen rezultat vzorca številka 14 je tako verjetno posledica eksperimentalne napake. Komplet Roche ima višjo mejo občutljivosti; ocenili smo jo na okoli 5000 kopij genoma na mililiter vzorca. Rezultati, dobljeni s kompletom Roche, se z rezultati, dobljenimi s kompletom Artus, ujemajo v 33 odstotkih (5 od 15). Štirje vzorci od teh petih niso vsebovali DNA. To pomeni, da diagnostični kompleti Artus, Roche in Argene ne dajejo lažno pozitivnih rezultatov.

Rezultati, dobljeni z diagnostičnim kompletom Argene, se z rezultati zunanje evropske kontrole ujemajo v 80 odstotkih (12 od 15). Lažno negativnih rezultatov nismo dobili. Občutljivostno mejo kompleta Argene lahko ocenimo na okoli 200 kopij genoma EBV na mililiter vzorca. Rezultati, dobljeni s kompletom Argene, kažejo dobro ujemanje z rezultati dobljenimi s kompletom Artus - 80 odstotno (12/15); slabše so se rezultati, dobljeni s kompletom Argene ujemali z rezultati dobljenimi s kompletom Roche - 47 odstotno (7/15).

Rezultati vseh treh diagnostičnih kompletov se ujemajo v štirih vzorcih (en pozitiven rezultat in trije negativni). To morda kaže na majhno možnost lažno pozitivnih rezultatov.

Pri kliničnih materialih - brisih žrela, polimorfonuklearnih celicah, plazmi, serumih in kostnem mozgu, je ujemanje rezultatov, dobljenih s kompletoma Artus in Roche 50 odstotno. Najbolje se rezultati ujemajo pri določanju števila kopij v polimorfonuklearnih celicah. Komplet Roche višjo mejo občutljivosti v primerjavi s kompletom Artus, ki ima občutljivostno mejo okoli 500 kopij genoma na mililiter vzorca. Tako smo s kompletom Roche dobili štiri lažno negativne rezultate - komplet Artus jih je prepoznal kot pozitivne. Tudi Whiley poroča o slabši občutljivosti kompleta Roche v primerjavi s kompletom Artus in tako posledično večjem številu lažno negativnih rezultatov (Whiley in sod., 2003).

Do lažno negativnih rezultatov lahko prihaja zaradi možnosti mutacij na mestu pripenjanja začetnih oligonukleotidov, zaradi česar se začetna oligonukleotida ne moreta vezati na verigo DNA, s tem se gen ne pomnožuje. Pri virusih v naravnem okolju lahko v daljšem časovnem obdobju prihaja do mutacij. Tako se lahko zgodi, da reagenti diagnostičnega kompleta, začetni oligonukleotidi ali sonde za detekcijo niso več primerni za posamezen virus. Ruiz in sodelavci poročajo o večjem številu negativnih rezultatov, ki so jih dobili z reagenti Roche, v primerjavi z reagenti Artus (Ruiz in sod., 2005). O pomembnosti homologije med začetnimi oligonukleotidi in sondami ter virusnim genomom poroča tudi Whiley. Na uspešnost pomnoževanja, detekcijo in genotipizacijo lahko vpliva že ena sama sprememba v nukleotidnem zaporedju odseka genoma, za katerega je proizvajalec zasnoval reagente. Pred tem pa je prav tako pomembna pravilna izbira dela genoma, ki ga DNA polimeraza pomnožuje. Whiley opisuje veliko variabilnost določenih genov, tudi gena za DNA polimerazo, ki ima sicer zelo pomembno vlogo. Za uspešen PCR predlaga kot tarčni odsek del gena za glikoprotein D (Whiley in sod., 2003). V navodilih za uporabo diagnostičnega kompleta Roche proizvajalec ne navaja, kateri je tarčni odsek pomnoževanja.

Kompletu Artus smo določili mejo občutljivosti pod 500 kopij na mililiter vzorca upoštevajoč dejstvo, da komplet Artus določuje do desetkrat nižje koncentracije v primerjavi z realnimi koncentracijami. Do tega dejstva smo prišli na podlagi rezultatov testiranja vzorcev iz zunanje evropske kontrole. Koncentracije v kopijah genoma na mililiter smo uporabili kot referenco.

S kompletom Argene smo v primerjavi z drugima dvema kompletoma dobili nižje koncentracije. Občutljivostna meja je nad 10.000 kopij/ml. Rezultati, dobljeni s kompletom Argene, so mnogokrat negativni. V vzorcih plazme in polimorfonuklearnih celicah nismo določili DNA virusa. To je lahko posledica zasnove reagentov v kompletu. Proizvajalec

kompleta Argene v navodilih navaja, da so reagenti najprimernejši za določanje DNA EBV v krvi (EBV R-geneTM..., 2005). Lahko zaključimo, da komplet Argene za diagnostiko DNA EBV v plazmi, brisih žrela in v polimorfonuklearnih celicah ni primeren, pač pa samo za kri.

S hitrim kvantitativnim »real-time« PCR-om v dobri uri pridemo do rezultata, kar je v primerjavi s kvalitativnim »in-house« PCR velik napredek. Vendar še vedno ni znano ali tako hiter test resnično ohrani vse lastnosti metode, na katerih je PCR zasnovan, in ali je mogoče zadostiti vsem zahtevam, ki so za zanesljivost testa pomembne. Hilscher s sodelavci omenja nižjo občutljivost »real-time« PCR zaradi prekratkega časa, ki bi omogočil ob pravi temperaturi točno določen korak PCR (Hilscher in sod., 2005).

5.2 SKLEPI

Okužbe centralnega živčnega sistema z virusom herpesa simpleksa predstavljajo za bolnike z zmanjšanim imunskim odzivom veliko nevarnost, ki se lahko konča s smrtjo. Potek bolezni in možnost okrevanja sta odvisna od pravočasnega zdravljenja, ki brez hitre in pravilne diagnoze ni mogoče.

PCR v realnem času uporabljamo za dokaz DNA EBV predvsem pri bolnikih po presaditvi celic kostnega mozga in organov; pozitiven rezultat predstavlja nevarnost za razvoj limfoproliferativne bolezni.

Na tržišču je več diagnostičnih kompletov za PCR v realnem času različnih proizvajalcev. V naši raziskavi smo preizkusili več različnih kompletov za diagnostiko HSV in EBV. Sklepi so naslednji:

- Občutljivost diagnostičnih kompletov proizvajalcev Artus, Roche in Argene smo ovrednotili glede na rezultate zunanje evropske kontrole.
- Za diagnostiko okužb s HSV ima diagnostični komplet Artus občutljivost pod 500 kopij genoma na mililiter vzorca, diagnostični komplet Roche pa okoli 10.000 kopij genoma na mililiter vzorca.
- Glede na rezultate zunanje evropske kontrole daje komplet Roche za diagnostiko okužb s HSV nad mejo občutljivosti (10.000 kopij genoma na mililiter vzorca)

boljše rezultate kot komplet Artus, ki v večini primerov določi koncentracijo genoma za en eksponent nižje.

- Za diagnostiko okužb s HSV kompleta Artus in Roche ne dajeta lažno pozitivnih rezultatov.
- Za diagnostiko okužb z EBV imajo uporabljeni diagnostični kompleti naslednjo mejo občutljivosti: Artus pod 1.000 kopij genoma na mililiter vzorca, Roche okoli 5.000 kopij genoma na mililiter vzorca, Argene okoli 200 kopij genoma na mililiter vzorca.
- Glede na rezultate zunanje evropske kontrole dajeta kompleta Roche in Argene za diagnostiko okužb z EBV boljše rezultate kot komplet Artus, ki v večini primerov določi koncentracijo genoma v vzorcu za en eksponent nižje.
- Za diagnostiko okužb z EBV je komplet Argene primeren za določanje EBV DNA v krvi. Za druge klinične materiale ni primeren.
- Za diagnostiko okužb z EBV kompleta Artus in Roche dajeta pri preiskavi kliničnih materialov primerljive rezultate.
- Za posamezen diagnostični komplet je potrebno določiti klinično pomembno mejo občutljivosti.

6 POVZETEK

Virusa herpes simpleks in virus Epstein-Barr sta zelo razširjena; okuženega je približno 95 odstotkov svetovnega prebivalstva. Herpesvirusi po primarni okužbi vzpostavijo v celici latentno stanje in se ob zmanjšani imunski sposobnosti gostitelja lahko reaktivirajo.

HSV povzroča predvsem infekcije kože in sluznic, pri zapletih lahko okuži centralni živčni sistem. EBV je prvi virus, ki so ga povezali z nastankom malignih tumorjev, povzroča limfoproliferativne bolezni v stanjih imunske pomanjkljivosti.

Za uspešno zdravljenje, ki mora nastopiti čim bolj zgodaj, je pomembna pravilna in hitra diagnoza. V zadnjem času v diagnostičnih laboratorijih klasične metode vse bolj zamenjujejo metode molekularne biologije. Kvantitativni PCR v realnem času omogoča hitro in zanesljivo diagnostiko. Tržišče ponuja več komercialno dostopnih diagnostičnih kompletov različnih proizvajalcev, ki si med seboj konkurirajo. Mi smo preiskusili dva diagnostična kompleta za diagnostiko okužb s HSV: Artus (Nemčija) in Roche (ZDA) ter tri za diagnostiko okužb z EBV: Artus (Nemčija), Roche (ZDA) in Argene (Francija). Diagnostične komplete smo preiskusili na aparaturi LightCycler 2.0 Roche (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA). Diagnostične komplete smo preiskusili na vzorcih iz zunanje evropske kontrole in na kliničnih materialih. Pri vseh omenjenih diagnostičnih kompletih smo preverjali mejo občutljivosti, možnost lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov in specifičnost testa.

Specifičen odsek virusnega genoma smo pomnoževali z že pripravljenimi reagenti iz diagnostičnega kompleta, detekcija PCR pridelka je potekala s specifičnimi fluorescirajočimi sondami. Kvantifikacijo smo izvedli s standardno krivuljo. Rezultate smo izrazili v kopijah genoma na mililiter vzorca.

S preiskavo smo ugotovili, da ima komplet Artus za diagnostiko okužb s HSV občutljivostno mejo pod 500 kopij genoma na mililiter vzorca. Komplet Roche za diagnostiko HSV ima v primerjavi s kompletom Artus višjo mejo občutljivosti, okoli 10.000 kopij genoma na mililiter vzorca. Zaradi tega smo s kompletom Roche dobili lažno negativne rezultate pri vzorcih, ki so vsebovali nižjo koncentracijo genoma od njegove meje občutljivosti. Nad doseženo mejo občutljivosti smo s kompletom Roche dobili višje koncentracije genoma v vzorcu v primerjavi s kompletom Artus. Lažno pozitivnih rezultatov nismo dobili z nobenim kompletom. Reagenti so virusno specifični, saj smo pri

testiranju vzorca, ki je vseboval genom VZV, dobili negativen rezultat. Težav z genotipizacijo nismo imeli.

V drugem delu preiskave smo ugotovljali primernost treh diagnostičnih kompletov za diagnostiko okužb z EBV. Za komplet proizvajalca Argene smo določili mejo občutljivosti okoli 200 kopij genoma na mililiter vzorca. Kompletu Artus smo določili mejo občutljivosti pod 500 kopij genoma na mililiter vzorca, kompletu Roche pa okoli 5.000 kopij genoma na mililiter. Kadar je bila koncentracija genoma v vzorcu pod mejo občutljivosti, smo dobili lažno negativne rezultate. Lažno pozitivnih rezultatov nismo dobili. Kljub dobri občutljivosti kompleta Argene, smo ugotovili, da je primeren samo za določanje števila kopij genoma EBV v krvi, ne pa v drugih kliničnih materialih.

V prihodnosti bi bilo smiselno določiti in postaviti klinično pomembno mejo v številu kopij genoma na mililiter vzorca, ki za bolnika predstavlja nevarnost. Nekaj kopij virusnega genoma je v osebi, ki je z virusom okužena, normalno. Lahko gre celo za mrtve viruse. Tako bi bilo pomembno ugotoviti, kolikšno število kopij virusnega genoma pomeni reaktivacijo virusa, s tem pa možnost zapleta pri bolniku.

7 VIRI

- Akhan S.C., Coskuncan F., Mutlu B., Gundes S., Vahaboglu H., Willke A. 2001. A probable case of herpes simplex encephalitis despite negative PCR findings. *Infection* 29, 6: 359-361
- Alter S. 2005. Herpes simplex virus infection. Dayton, Children's Medical Center at Dayton
<http://www.emedicine.com/PED/topic995.htm> (7. marec, 2006): 22 str.
- Aucejo F., Rofaiel G., Miller C. 2005. Who is at risk for post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after liver transplantation? *Journal of Hepatology*, 44, 1: 19-23
- Avšič-Županc T. 2002. Posredno dokazovanje virusov. V: Koren S., Avšič-Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. Splošna medicinska virologija. Koren S. (ed.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 119-128
- Cinque P., Bossolasco S., Lundkvist A. 2003. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *Journal of Clinical Virology*, 26: 1-28
- Cleator G.M., Klapper P.E. 2004. Herpes Simplex. V: Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology, 23rd ed. Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. (eds.). New York, McGraw Hill Companies: 27-51
- Crawford D.H. 2004. Epstein – Barr virus. V: Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology, 23rd ed. Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. (eds.). New York, McGraw Hill Companies: 123-146
- Domiatti-Saad R., Scheuermann R.H. 2006. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clinica Chimica Acta*, 363, 1-2: 197-205
- Doornum van G.J.J., Guldemeester J., Osterhaus A.D.M.E., Niesters H.G.M. 2002. Diagnosing herpesvirus infection by real-time amplification and rapid culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2: 576-580

Drinovec B. 2002. Splošne lastnosti virusov. V: Koren S., Avšič-Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. Splošna medicinska virologija. Koren S. (ed.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 1-11

EBV R-geneTM Quantification kit. 2005. Varilhes, Argene SA. 31 str.

Fafi-Kremer S., Brengel-Pesce K., Barges G., Bourgeat M.J., Genoulaz O., Seigneurin J.M., Morand P. 2004. Assesment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein-Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *Journal of Clinical Virology*, 30: 157-164

Hardie D. 1999. Epstein Barr Virus. Cape town, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town.

<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/jmoodie/ebv2.html> (7.marec, 2006): 3str.

Hilscher C., Vahrson W., Dittmer D.P. 2005. Faster quantative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability. *Nucleic Acid Research*, 33, 21: 1-8

Kit for detection and differentiation of herpes simplex virus type 1 nad herpes simplex virus type 2 DNA in research samples, using the LightCycler instrument, instruction manual. 2003. Penzberg, Roche Diagnostics GbmH. 25 str.

Koren S. 2002. Virusi in tumorji. V: Koren S., Avšič-Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. Splošna medicinska virologija. Koren S. (ed.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 79-88

Koren S., Marin J. 2002. Razmnoževanje virusov. V: Koren S., Avšič-Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. Splošna medicinska virologija. Koren S. (ed.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 23-35

Leutenegger C.M. 2001. The real-time TaqMan PCR and applications in veterinary medicine. *Veterinary Sciences Tomorrow*, 1: 1-15

LightCycler 2.0 Instrument - Operator's manual version 1.2. 2003. Indianapolis, Roche Diagnostics. 96-99

Linde A., Klapper P.E., Monteyne P., Echevarria J.M., Cinque P., Rozenberg F., Vestergaard B.F., Ciardi M., Lebon P., Cleator G.M. 1997. Specific diagnostic methods for herpesvirus infection of the central nervous system: A consensus review by the European Union concerted action on Virus meningitis and encephalitis. *Clinical and Diagnostic Virology*, 8: 83-104

Marin J. 2002. Neposredno dokazovanje virusov. V: Koren S., Avšič-Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. Splošna medicinska virologija. Koren S. (ed.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 109-118

Marin J., Klemenc P. 2005. Molecular diagnostics of human herpesviruses. V: Molekularna diagnostika v medicini, zbornik predavanj. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Milčinskega, 36. Memorialni sestanek profesorja Jameza Plečnika, 1. srečanje Slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo, letno srečanje Sekcije za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije Slovenskega zdravniškega društva, 30. november – 2. december 2005. Luzar B., Poljak M., Glavač D., Blažič J. (eds.). Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 379-385

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 2002a. Human herpesvirus. V: Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology*. 4th ed. St.Louis, Mosby: 475-498

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 2002b. Molecular diagnosis. V: Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology*. 4th ed. St.Louis, Mosby: 162-166

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 2002c. Serologic diagnosis. V: Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A.. *Medical microbiology*. 4th, St. Louis, Mosby: 167-173

Niesters H.G.M. 2002. Clinical virology in real time. *Journal of Clinical Virology*, 25, 3: 3-12

Niesters H.G.M., Van Esser J., Fries E., Wolthers K.C., Cornelissen J., Osterhaus A.D.M.E. 2000. Development of real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 712-715

Nicoll S., Brass A., Cubie H.A. 2001. Detection of herpes viruses in clinical samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 96: 25-31

PREMIER Biosoft International. 2005. TaqMan[®] Probes. Palo Alto, Premier Biosoft International.

http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/TaqMan.html (25. april, 2005): 2 str.

Razavi B., Razavi M. 2001. Herpes simplex encephalitis – An atypical case. *Infection*, 29, 6: 357-358

Read S.J., Mitchell J.L., Fink C.G. 2001. LightCycler Multiplex PCR for laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. *Journal of Clinical Microbiology*, 39,9: 3056-3059

Ruiz G., Pena P., Ory de F., Echevarria J.E. 2005. Comparison of commercial real-time PCR assays quantification of Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5: 2053-2057

Schmid S. 2005. Epstein-Barr virus. Atlanta, National Center for Infectious Diseases.

<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/ebv.htm> (1.marec, 2006): 4 str.

Schmutzhard J., Riedel H.M., Zwegberg Wirgart B., Grillner L. 2002. Detection of herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *Journal of Clinical Virology*, 29: 120-126

Smith T.F., Uhl J.R., Espy M.J., Sloan L.M., Vetter E.A., Jones M.F., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 2004. Development, implementation, and trend analysis of real-time PCR tests for the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, 26, 19: 145-153

Valentine-Thon E. 2002. Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? *Journal of Clinical Virology*, 25: 13-21

Webber S.A., Naftel D.C., Fricker F.J., Olesnevich P., Blume E.D., Addonizio L., Kirklin J.K., Canter C.E. 2006. Lymphoproliferative disorders after pediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Lancet*, 367: 233-239

Whiley D.M., Syrmis M.W., Mackay I.M., Sloots T.P. 2003. Preliminary comparison of three LightCycler PCR assays for the detection of herpes simplex virus in swab specimens. *European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease*, 22: 764-767

Winnie G.B. 2005. Mononucleosis and Epstein-Barr virus infection. Pittsburgh, University of Pittsburgh and Children's Hospital Pittsburgh.
<http://www.emedicine.com/PED/topic705.htm> (22.februar, 2006): 18 str.

Yancoski J., Danielian S., Ibanez J., Turconi A., Cuarterolo M., Zelazko M., Niesters G.M.H. 2004. Quantification of Epstein-Barr virus load in Argentinean transplant recipients using real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*, 31: 58-65

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici, dr. Jožici Marin, za mentorstvo pri mojem diplomskem delu in da sem se lahko obrnila nanjo resnično v vsakem trenutku.

Zahvaljujem se zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko herpesvirusov in respiratornih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, Katji in Snežani, predvsem pa dr. Poloni Klemenc, ki se je izkazala z neizmerno potrpežljivostjo in prijaznostjo. Zaradi njih mi je bilo delo v laboratoriju v veselje in nepozabno.

Zahvaljujem se svoji somentorici, dr. Minki Kovač, za somentorstvo pri mojem diplomskem delu. Poleg neusahljivega vira znanja, sem bila od nje deležna trdne opore. Ko so se mi zaprla vsa vrata, mi je ona odprla okno.

Zahvaljujem se dr. Evi Ružič-Sabljić, za recenzijo diplomskega dela in pomembne pripombe.

Zahvaljujem se očetu in mami, ki sta mi omogočila študij, brez katerega ne bi bila to, kar sem. Hvala za zaupanje in podporo.

Hvala Srečkotu, ki mi je v najhujših trenutkih stal ob strani in mirno ter potrpežljivo prenašal moje muhe in nejevoljo pred izpiti.

Hvala sestri Andreji in Šimnu za vse nasvete in pomoč.

Hvala Manji za prevod in koristne nasvete.

Hvala Katji za podporo in vzpodbudo skozi vsa leta.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste kakorkoli drugače pripomogli k izvedbi diplomskega dela.

Brez vseh vas moj študij in diplomsko delo ne bi bila to, kar sta.

Hvala!

Barbara Breznik