

Grzegorz Machnik¹⁾, Ewa Pelc²⁾, Małgorzata Zapala²⁾, Monika Gąsecka-Czapla²⁾,
Grzegorz Kaczmarczyk²⁾, Danuta Kozłowska²⁾, Bogusław Okopień¹⁾

OPRACOWANIE I OPTYMALIZACJA TECHNIKI REAL-TIME RT-PCR DO DETEKЦИИ GENOMU WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV) W SUROWICY KRWI DLA CELÓW KONTROLI WEWNĄTRZLABORATORYJNEJ

DESIGNING AND OPTIMIZATION OF REAL-TIME RT-PCR TECHNIQUE FOR THE DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) GENOME IN BLOOD SERUM AS INTERNAL LABORATORY QUALITY CONTROL

¹⁾ Katedra Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

²⁾ Pracownia Biologii Molekularnej, DIAGNOSTYKA Spółka z o.o.

STRESZCZENIE

Obecnie istnieje duże zapotrzebowanie na metodę do oznaczania obecności wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w próbkach pacjentów. Praca opisuje autorską technikę wykrywania materiału genetycznego HCV w surowicy krwi opartą na dwóch następujących po sobie reakcjach: odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*, RT) i reakcji łańcuchowej polimerazy z odczytem sygnału w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction*, rPCR). Do wykrywania HCV zastosowano sondę molekularną znakowaną fluorescencyjnie oraz specyficzne startery komplementarne do sekwencji 3'UTR wirusa wzv C. Przeprowadzono optymalizację warunków reakcji i ustalono stężenia sondy oraz starterów, które mogą być stosowane w praktyce laboratoryjnej. Kontrolę endogenną reakcji stanowił fragment genu dehydrogenazy 3-fosforanu gliceraldehydu (GAPDH). Reakcję wykrywania HCV i GAPDH prowadzono w jednej mieszaninie reakcyjnej (reakcja multipleksowa).

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu C, reakcja łańcuchowa polimerazy, detekcja

ABSTRACT

The need of hepatitis C virus (HCV) monitoring in serum samples of infected persons is of particular importance, because of chronic and non-symptomatic disease course of hepatitis C infection. We developed a novel "in-house" method variant for the detection of HCV genetic material in human blood serum. Detection technique is based on reverse transcription- real time polymerase chain reaction (RT-rPCR). We designed and analyzed several HCV 5' UTR- complementary PCR starter and probe sequence sets and we chose one set of highest HCV detection potency. Optimal concentration of starters and probe has been found. The 226-base pair long fragment of constitutively expressed glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene served as internal endogenous control and should be added to each analysis in order to ensure that no PCR inhibitors are present. All parameters were optimized for Mx3005 QPCR System (Agilent Technology).

Key words: hepatitis C, Polymerase Chain Reaction, detection

WSTĘP

Wirus zapalenia wątroby typu C (ang. hepatitis C virus, HCV) jest patogenem istotnym z diagnostycznego punktu widzenia ze względu na powszechność jego występowania w populacji ludzkiej oraz poprzez charakter zakażenia, którego początkowy okres u około 50% zakażonych przebiega bezobjawowo i w związku z tym wiąże się z dużym ryzykiem transmisji wirusa.

U dużej liczby osób zakażonych HCV choroba przyjmuje postać przewlekłą, co stanowi poważny czynnik ryzyka wystąpienia pierwotnych nowotworów wątroby (1). Po dużym wzroście zakażeń w Polsce w latach 1997-2005 w kolejnych kilku latach notowano niewielki spadek zapadalności; w roku 2009 zapadalność obniżyła się do poziomu 5,08 na 100 000. Należy jednak mieć na uwadze, że ze względu na przewlekły charakter infekcji, kolejne zakażone osoby zwiększają ogólną chorobowo-

wość polskiej populacji (1, 2). W publikacji Chlabicza i wsp. podano, że wśród dawców krwi z terenu północno-wschodniej Polski obecność przeciwciał anti-HCV wykazano średnio u 0,46% badanych osób (3). W przypadku zakażeń HCV duży odsetek pacjentów jest diagnozowany dopiero w przewlekłym stadium zapalenia wątroby, odległym czasowo od momentu zakażenia lub dowiadyuje się o nosicielstwie przypadkowo, przy okazji zleczanych rutynowych badań laboratoryjnych.

Do wykrycia HCV w organizmie pacjenta można stosować techniki serologiczne, które opierają się na potwierdzeniu obecności przeciwciał przeciwko HCV we krwi pacjenta. Przy stosowaniu technik immunowykrywania trzeba brać pod uwagę zjawisko okienka serologicznego, tzn. w okresie po zakażeniu pacjenta, a przed pojawieniem się przeciwciał we krwi można nie wykryć obecności wirusa. Obecnie stosowane techniki immunowykrywania nowej generacji znacznie ograniczyły czas trwania okienka serologicznego (4). Metoda wykrywania kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acid amplification technology*, NAT) we krwi dawców pozwala na wykrycie obecności wirusów praktycznie już od momentu pojawienia się wirusa w organizmie. Za pomocą techniki NAT RNA-HCV została potwierdzona pewna liczba pacjentów – nosicieli HCV posiadających jednocześnie ujemny wynik badania na obecność markerów serologicznych (5). Odsetek ten wynosił około 0,0021% (50 przypadków na 2,37 mln przebadanych próbek seronegatywnych)(6). Istotne jest, że w takich przypadkach częstotliwość występowania poszczególnych podtypów HCV była odmienna niż w grupie osób przewlekle zakażonych. Szczególnie często obserwowano podtyp 3a. Z kolei podtyp 1b był mniej liczny niż w przypadku pacjentów ze stwierdzoną obecnością przeciwciał anti-HCV. Obecnie techniki oparte na wykrywaniu RNA HCV są prowadzone rutynowo w licznych stacjach krwiodawstwa (6) oraz w laboratoriach analityki medycznej (informacja własna oparta na analizie ofert rynkowych z kwietnia 2010 r.).

HCV należy do rodziny Flaviviridae, rodzaju hepacjowirusów. Ma genom zbudowany z jednoniciowego kwasu rybonukleinowego (RNA), co ma poważne implikacje praktyczne, ponieważ RNA poza ustrojem ulega szybkiej degradacji na skutek powszechnej obecności rybonukleaz. Wymaga to dużej dbałości o jakość pobieranych próbek i o sposób ich przechowywania oraz transportu (8). Inną, niezmiernie ważną cechą jest to, że genom HCV jest bardzo zmienny. Na podstawie różnic w sekwencji materiału genetycznego wyróżnia się co najmniej sześć genotypów HCV, które z kolei dzieli się na wiele podtypów (9). Dlatego przy opracowaniu metody wykrywania materiału genetycznego HCV technikami NAT podstawowym problemem jest wybór odpowiedniego regionu docelowego (powinien on obejmować możliwie najmniej zmienny fragment

genomu). Większość testów komercyjnych i opracowań własnych wykorzystuje powinowactwo do regionu 5' nieulegającego translacji (ang. 5'- *untranslated region*, 5'-UTR) (10, 11). Wykrywanie materiału genetycznego HCV w badanej próbce przeprowadza się najczęściej techniką reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR), która musi być poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*, RT), ze względu na wspomniany wyżej rodzaj materiału genetycznego (RNA). Oba procesy, RT i PCR można prowadzić sekwencyjnie w tej samej próbce, co wykorzystuje się do wykrycia materiału genetycznego wirusów w próbkach klinicznych. Pozwala to na uproszczenie procedury, a przede wszystkim zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia (12, 13, 14).

Metoda RT-PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time* RT-PCR, rRT-PCR) powstała z rozwinięcia techniki RT-PCR, i pozwala na ocenę przyrostu liczby cząsteczek DNA w trakcie trwania reakcji. W metodzie *real-time* RT-PCR wykorzystuje się obecność barwników fluorescencyjnych, które emitują sygnał proporcjonalny do ilości powstającego produktu reakcji. Kluczowe znaczenie w generowaniu sygnału ma odpowiednio dobrana sonda molekularna. Opracowano różne rodzaje tych cząsteczek, różniących się od siebie odmiennym mechanizmem generowania sygnału. Zasadniczo do wykrywania patogenów (nie tylko wirusowych) w próbkach klinicznych stosuje się dobrze poznane i obecnie najpowszechniejsze sondy hydrolizujące typu TaqMan. System służący wykrywaniu określonego patogenu (np HCV) techniką rRT-PCR składa się z pary staterów (analogicznych jak w standardowej reakcji PCR/ RT-PCR) oraz z sondy, przy czym wszystkie trzy elementy muszą być komplementarne do sekwencji wykrywanego patogenu, a miejsce hybrydyzacji sondy znajduje się pomiędzy miejscami hybrydyzacji staterów. Po każdym kolejnym cyklu PCR łączna fluorescencja próbki wzrasta na skutek coraz większej ilości właściwego produktu reakcji, co pozwala na wykreślenie tzw. krzywej amplifikacji. Interpretacja wyniku w technice rRT-PCR polega na interpretacji tej krzywej, a ściślej na ocenie wartości Ct (ang. *threshold cycle*), czyli numeru cyklu w reakcji PCR, w którym fluorescencja badanej próbki przekroczyła tzw. poziom tła. Im wyższa jest wyjściowa liczba cząsteczek (patogenu) w badanej próbce, tym niższa wartość Ct (poziom mierzonej fluorescencji szybciej przekracza poziom tła). Jeżeli analiza ma charakter jakościowy, to wówczas przekroczenie poziomu tła (uzyskanie jakiegokolwiek dodatniej wartości Ct) wskazuje na obecność poszukiwanego patogenu w badanej próbce. W praktyce jednak wysoka wartość Ct skłania do ostrożności w interpretacji wyniku i do powtórnej analizy materiału (15).

Celem pracy było opracowanie własnego wariantu metody rRT-PCR do zastosowania w praktyce diagnostycznej w celu wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu C. Technika wykorzystuje startery do reakcji PCR swoiste do określonego regionu HCV oraz fluorescencyjną sondę molekularną, tzw. sondę hydrolizującą typu TaqMan (Applied Biosystems).

MATERIAŁ I METODY

Analiza materiału genetycznego HCV. Sekwencje 5'-UTR sześciu genotypów HCV porównano między sobą za pomocą oprogramowania Emma (16). Wytypowano najbardziej konserwatywny region, w którym zaprojektowano zestawy starterów oraz sond do reakcji PCR za pomocą programu Eprimer3 (EMBOSS). Następnie ponownie przeanalizowano uzyskane wyniki pod kątem zgodności sekwencji z poszczególnymi genotypami HCV, w tym zwłaszcza genotypów 1b, 1a, oraz 3a, które występują najczęściej w populacji polskiej lub stanowią duży odsetek w przypadku nosicieli z ujemnym wynikiem na obecność przeciwciał anti-HCV (6). Łącznie zaprojektowano 10 zestawów starterów/sond i wyselekcjonowano dwie pary, które wykazywały najwyższą komplementarność względem wszystkich typów genetycznych HCV.

Ekstrakcja materiału genetycznego wirusa. Do ekstrakcji materiału genetycznego zastosowano aparat do automatycznej ekstrakcji DNA i RNA z próbek klinicznych NucliSENS EasyMAG (Biomerieux, Polska). Materiał wyjściowy stanowiło 200µl mieszaniny próbek surowicy zawierających RNA HCV (źródło: Quality Control For Molecular Diagnostics, QCMD 2009 Hepatitis C virus RNA EQA Programme). Jako matrycę do syntezy fragmentu genu dehydrogenazy 3-fosforanu gliceraldehydu- GAPDH (kontrola endogenna reakcji) zastosowano komórki linii hodowlanej nerki człowieka HEK 293. Zawiesinę zawierającą około 500 000 komórek dodano do każdej próbki surowicy na etapie ekstrakcji kwasów nukleinowych.

Optymalizacja warunków reakcji rRT-PCR. Wszystkie analizy prowadzono z użyciem termocyklera do wykrywania produktu w czasie rzeczywistym Mx3005P QPCR System (Stratagene). Do reakcji użyto odczynnika Brilliant II SYBR Green QRT-PCR 2X master Mix. W pierwszej kolejności przeprowadzono optymalizację stężeń starterów do reakcji PCR. Do reakcji użyto czterech stężeń od 50 nM do 600 nM w różnych kombinacjach. Po ustaleniu właściwych stężeń starterów przeprowadzono optymalizację stężenia sondy molekularnej. Reakcję prowadzono z użyciem odczynnika Brilliant II QRT-PCR Low ROX Master Mix (Stratagene). Przeprowadzono analizę sześciu

różnych stężeń sondy molekularnej: 50, 100, 150, 200, 300 i 400nM.

Kontrola endogenna reakcji. Kontrolę endogenną reakcji stanowił fragment genu dehydrogenazy 3-fosforanu gliceraldehydu (GAPDH). Startery oraz sondę zaprojektowano za pomocą oprogramowania eprimer3 (EMBOSS). Jako wynik uzyskano 10 zestawów starterów i sond, z czego do analizy wybrano jeden. Jednocześnie analizowano przydatność zestawu, który znajduje się w bazie danych starterów i sond przeznaczonych do ilościowej reakcji Real time QPCR (17). Zestaw ten jest stosowany i opisywany wielokrotnie, np. przez Kelly i wsp. (18). Optymalizację przeprowadzono z użyciem odczynnika Brilliant II SYBR Green QRT-PCR 2X master Mix, stosując takie same kombinacje stężeń starterów, jak w przypadku HCV. Przeprowadzono analizę sześciu różnych stężeń sondy molekularnej: 50, 100, 150, 200, 300 i 400nM.

Multipleksowy real-time RT-PCR. Po wyborze odpowiednich warunków reakcji dla HCV i dla genu kontroli endogennej (GAPDH) przeanalizowano, czy oba zestawy starterów i sond mogą być użyte w jednej próbce w formie reakcji multipleksowej (ang. multiplex PCR).

Czułość metody. Czułość metody oznaczano za pomocą standardów ilościowych uzyskanych na drodze klonowania produktu RT-PCR wirusa zapalenia wątroby typu C. Proces klonowania przeprowadzono z użyciem zestawu StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit (Agilent, USA). Fragment genomu HCV, analogiczny jak w reakcji RT-QPCR, amplifikowano za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy Pfu. Uzyskane produkty klonowano do wektora plazmidowego pSC-B-amp/kan, transformowano bakterie kompetentne StrataClone SoloPack i przeprowadzono selekcję transformantów. Transformowane bakterie namnażano w pożywce płynnej LB a następnie przeprowadzono izolację plazmidowego DNA na małą skalę techniką mini-prep. (17). Obecność właściwych klonów potwierdzano za pomocą analizy restrykcyjnej z użyciem endonukleazy EcoRI oraz za pomocą PCR z użyciem starterów T3 i T7 komplementarnych do cząsteczki plazmidu. Bakterie zawierające plazmidowe DNA z poprawnie wklonowanym fragmentem HCV namnażano w 28ml pożywki płynnej LB i przeprowadzono izolację plazmidowego DNA za pomocą zestawu QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Niemcy). Plazmidowe DNA rozpuszczono ostatecznie w 250µl buforu TE. Stężenie plazmidowego DNA w ekstraktach określano spektrofotometrycznie przy długości fali 260nm. Dwa mikrogramy plazmidowego DNA poddano linearyzacji (hydrolizie restrykcyjnej) enzymem NcoI (EURx, Polska); proces linearyzacji plazmidów skontrolowano przez rozdział 3µl mieszaniny reakcyjnej w żelu agarozowym o stężeniu 1%. Następnie, w celu uzyskania ilościowych standardów

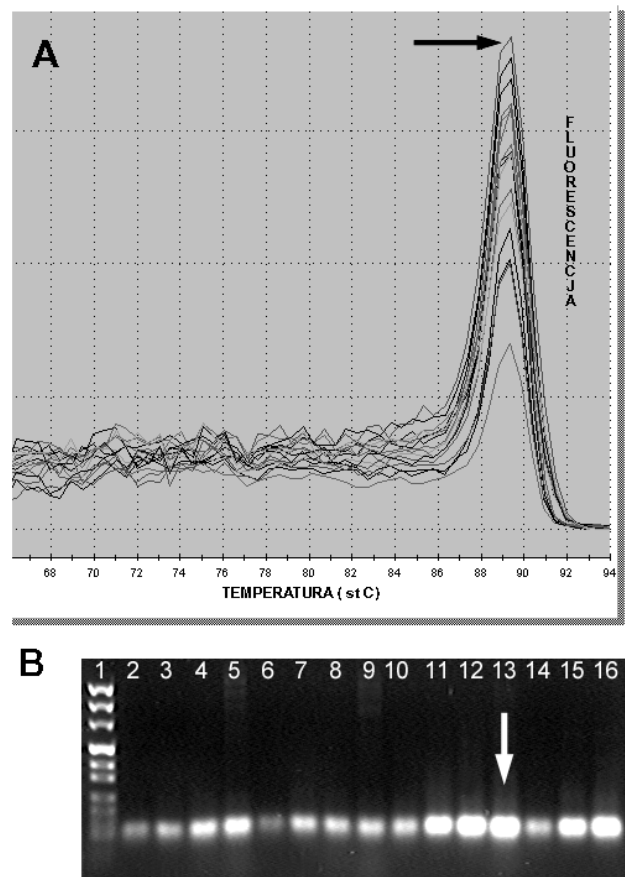
RNA HCV, przeprowadzono transkrypcję DNA *in vitro* z zastosowaniem polimerazy RNA T7 (Takara, Japonia). Skład mieszaniny reakcyjnej (objętość 20 μ L): 2 μ l 10x buforu polimerazy RNA T7; 5mM DTT; 2mM każdego z nukleotydów (ATP, GTP, CTP, UTP); 20U inhibitora RNA-zy; 50U polimerazy RNA T7 oraz 500ng matrycowego DNA. Transkrypcję prowadzono przy 42°C przez 2 godz. Po transkrypcji pozostałe, matrycowe DNA hydrolizowano za pomocą DNA-zy I (DNase I, RNase free, Fermentas, Litwa) poprzez dodanie do mieszaniny 2U enzymu i inkubację w 37°C przez 15 min., a następnie bezzwłocznie oczyszczano RNA z zanieczyszczeń za pomocą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej. Osad RNA rozpuszczano w 25 μ l RNA Storage Solution (Ambion, USA). Oceny stężenia RNA dokonywano dwójako: poprzez pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 260nm oraz techniką fluorymetryczną z użyciem odczynnika Quant-iT RiboGreen RNA Reagent (Life Technologies, USA) i na tej podstawie obliczono liczbę cząsteczek RNA w przeliczeniu na 1 μ l objętości ekstraktu RNA. Otrzymano wynik 91,8ng/ μ l RNA, co odpowiadało 1,14x10¹¹ kopii RNA HCV w 1 μ l ekstraktu. Do oceny czułości metody wykonano szereg rozcieńczeń próbek (standardów) RNA obejmujących stężenia RNA HCV od 10¹ – 10⁷ kopii/ próbkę. Dodatkowo do analizy wykorzystano próbki HCV RNA o określonej liczbie cząstek wirusowych pochodzących z kontroli zewnątrzlaboratoryjnej Quality Control For Molecular Diagnostics, QCMD 2009 Hepatitis C virus RNA EQA Programme. Próbkę tę poddano standardowej procedurze ekstrakcji kwasów nukleinowych z zastosowaniem aparatu NucliSENS EasyMAG (Biomerieux, Polska) i odpowiednich odczynników. Analizę czułości metody wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej próbki (standardu).

WYNIKI

Optymalne warunki reakcji (uzyskanie możliwie najniższej wartości Ct) uzyskano przy stężeniach starterów wynoszących 300nM; oceniano również poziom fluorescencji przy możliwie niskim progu wykrywania (Ct). Dane uzyskane z analizy komputerowej potwierdzono za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (rycina 1).

Optymalne stężenie sondy określono na 150nM.

Wyniki optymalizacji warunków reakcji dla genu kontroli endogennej (GAPDH) przedstawiono na rycinie 2. Po reakcji rRT-PCR produkty analizowano w 1,5% żelu agarozowym. Ze względu na słabszą fluorescencję, zestaw starterów przygotowanych wg własnego projektu odrzucono na rzecz starterów opisanych przez Kelly i wsp, pochodzące z bazy danych (18, 19). Optymalne stężenie sondy molekularnej dla GAPDH

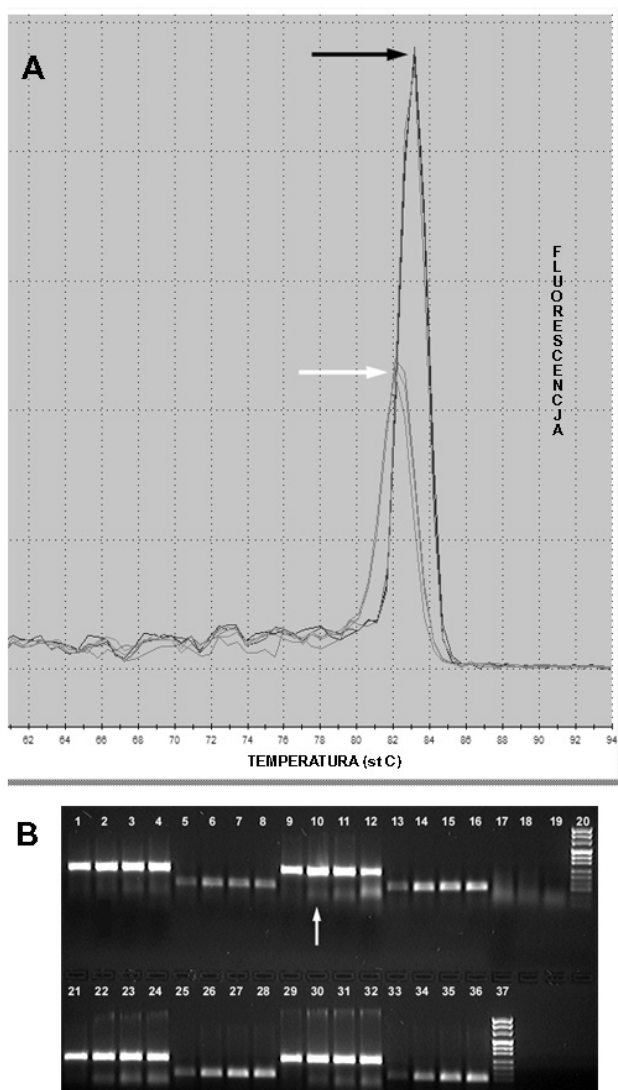


Ryc. 1 A. Krzywa dysocjacji DNA dla produktu rRT-PCR HCV. Strzałką oznaczono najwyższy poziom fluorescencji, który uzyskano w przypadku stężeń wynoszących 300nM każdego startera. Temperatura topnienia produktu (T_m) rRT-PCR dla HCV wynosiła 89,3°C i była zgodna z wyliczeniami teoretycznymi.

B. Elektroforetogram produktów reakcji rRT-PCR HCV. Optymalny wynik uzyskano dla stężeń 300nM każdego startera (oznaczone strzałką). Od lewej: 1.: Marker wielkości DNA pUC Mix Marker 8 (Fermentas), 250ng; 2.-16.: Produkty rRT-PCR HCV uzyskane przy różnych stężeniach starterów. Długość produktu: 92 par zasad;

Fig. 1 A. Disociation curve of rRT-PCR HCV product. Highest fluorescence level (indicated by an arrow) was obtained at the concentration of 300nM of both primers. Melting temperature (T_m), calculated for rRT-PCR product was 89,3°C and stay in accordance with data obtained by *in-silico* analysis.

B. Electrophoreogram of HCV rRT-PCR products. Optimal results were obtained at the concentration of 300nM for both primers (as indicated by arrow). From the left: 1.: pUC Mix Marker 8 DNA size marker (Fermentas), 250ng; 2.-16.: HCV rRT-PCR products of various primer concentrations. Product length: 92 base pair.



Ryc. 2 A. Krzywa dysocjacji dla produktu rRT-PCR GAPDH. Czarną strzałką oznaczono najwyższy poziom fluorescencji, który uzyskano w przypadku stężeń wynoszących 150nM każdego startera. Temperatura topnienia produktu (T_m) PCR dla GAPDH wynosiła $83,1^\circ\text{C}$ i była zgodna z wyliczeniami teoretycznymi. Wykres krzywej dysocjacji DNA dla produktu rRT-PCR GAPDH uzyskany za pomocą starterów projektowanych przez autorów oznaczono białą strzałką.

B. Elektroforetogram produktów reakcji rRT-PCR GAPDH. Optymalny wynik uzyskano dla stężeń wynoszących 150nM każdego startera (strzałką). Kolejność próbek: 20. i 37.: Marker wielkości DNA pUC Mix Marker 8 (Fermentas), 250ng; 1.-4., 9.-12., 21.-24 oraz 29-32.: startery opisane przez Kelly i wsp. (18). Długość produktu: 226 par zasad; 5.-8., 13.-16., 25.-28. oraz 33.-36.: startery wg projektu własnego. Długość produktu: 108 par zasad; 17.-19.: kontrola negatywna.

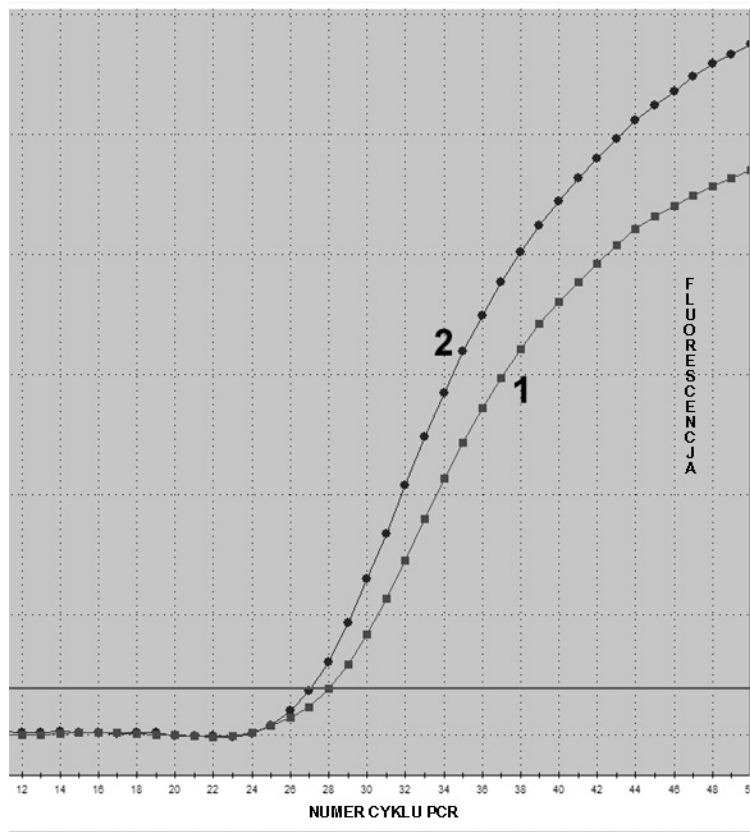
określono na 200nM, co było zgodne z danymi literaturowymi (rycina 2). Zbliżone rezultaty uzyskano przy stężeniach sondy wynoszących 100, 150 oraz 200nM. Ze względu na późniejsze wykorzystanie techniki multipleksowego real-time RT-PCR zdecydowano się na wybór możliwie najniższego stężenia sondy, w tym przypadku wynoszącego 100nM.

Podczas optymalizacji reakcji multipleksowej nie wykazano różnicy w wartościach Ct dla HCV w obecności i przy braku starterów i sondy do kontroli endogennej GAPDH (test T-studenta, $p=0,423$). Wyniki przedstawiono na rycinie 3. Również analiza mieszaniny reakcyjnej w 1,5% żelu agarozowym nie wykazała obecności nieswoistych produktów reakcji, co świadczy o zachowanej specyficzności reakcji (nie pokazano na rycinie).

Przy ocenie czułości metody, wynik dodatni uzyskano w próbkach obejmujących 10^7 - 10^2 kopii RNA HCV (w trzech powtórzeniach). Wynik ujemny uzyskano dla próbek zawierających 10^1 kopii RNA HCV oraz w próbkach nie zawierających RNA HCV. Wszystkie próbki panelu QCMD 2009 Hepatitis C virus RNA EQA Programme dały wynik dodatni. Liczba jednostek HCV w próbkach panelu kontrolnego wynosiła od 540 do 9200 IU/ml. Wynik ujemny uzyskano w próbce zawierającej surowicę pozbawioną RNA HCV (również należąca do panelu kontrolnego QCMD).

Fig. 2 A. Dissociation curve of rRT-PCR GAPDH product. Highest fluorescence level (black arrow) was obtained at the concentration of 150nM of both primers. Melting temperature (T_m) calculated for rRT-PCR product was $83,1^\circ\text{C}$ and stay in accordance with published data. White arrow indicates dissociation curve for GAPDH rRT-PCR product if primers designed by authors were used (lower fluorescence level is observed).

B. Electrophoretogram of GAPDH rRT-PCR product. Optimal results were obtained at the concentration of 150nM for both primers (indicated by an arrow). Samples 20 and 37: pUC Mix Marker 8 DNA size marker (Fermentas), 250ng; 1.-4., 9.-12., 21.-24 and 29-32.: primer pair according to Kelly and al. (18). Product length: 226 base pairs; 5.-8., 13.-16., 25.-28. and 33.-36.: authors' designed primers. Product length: 108 base pair; 17.-19.: negative control.



Ryc. 3 Krzywe amplifikacji dla reakcji rRT-PCR HCV bez dodatku starterów i sondy dla kontroli endogennej (nr 1) oraz po dodaniu starterów i sondy dla kontroli endogennej (nr 2). Nie wykazano spadku czułości reakcji

Fig. 3 Amplification curves for rRT-PCR HCV without (No 1) or with (No 2) addition of endogenous control primers and probe. No decrease of reaction sensitivity was observed

DYSKUSJA

W chwili obecnej opisano kilka technik NAT wykorzystywanych do wykrywania patogenów w próbkach klinicznych (15, 20). W przypadku wirusa zapalenia wątroby typu C dostępne są zarówno ilościowe, jak i jakościowe testy komercyjne, przeznaczone do diagnostyki *in vitro*. Są to np. Abbott RealTime HCV test (Abbott Molecular Inc.), Cobas TaqMan HCV test oraz Cobas Monitor Amplicor HCV 2.0 (Roche Molecular Systems Inc., USA), HCV SuperQuant (National Genetic Institute, USA), Versant HCV RNA (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.). Metody te stanowią zazwyczaj tzw. systemy zamknięte, co uniemożliwia popełnienie błędów i gwarantuje wysoką jakość analizy, lecz z drugiej strony wymaga zakupu określonego sprzętu i odczynników, co nie zawsze jest możliwe do zrealizowania w przypadku niewielkich laboratoriów oraz jednostek niewykonywających prac o charakterze diagnostycznym. Ponadto w części testów komercyjnych wykorzystywane są płytki 96-dołkowe, stąd analiza mniejszej liczby próbek wiąże się ze stratami odczynników i materiałów.

Oprócz systemów komercyjnych w literaturze opisywane są własne opracowania różnych zespołów badawczych, które pozwalają na wykrycie HCV w prób-

kach klinicznych technikami NAT (10, 11, 12, 21). System kontroli jakości badań laboratoryjnych Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) ma na celu okresową walidację skuteczności metod opartych na wykrywaniu kwasów nukleinowych stosowanych w laboratoriach analitycznych. W programie Hepatitis C virus RNA EQA 2009 jako jeden z typów testów dopuszcza się tzw. metodę „in-house”. Publikowane są również prace, które mają na celu wprowadzenie standaryzowanych próbek referencyjnych dla laboratoriów stosujących technikę real-time PCR w wykrywaniu HCV technikami „in-house” (22).

Autorzy opracowania do wstępnej optymalizacji warunków real-time RT-PCR zastosowali odczynnik zawierający fluorescencyjny barwnik SYBR Green. Przy stosowaniu interkalatorów uzyskane krzywe amplifikacji należy zawsze dodatkowo zweryfikować na podstawie tzw. krzywej topnienia (ang. melting curve) produktu PCR. Temperatura topnienia jest charakterystyczna dla konkretnego amplimeru i zastosowanych warunków reakcji; w próbkach zawierających poszukiwany gen powinny być uzyskane jednakowe wartości (patrz ryciny 2, 4). Barwników interkalujących zazwyczaj nie stosuje się do wykrywania patogenów w próbkach klinicznych, natomiast są one nieocenione

na etapie doboru optymalnych warunków PCR. Dodatkowo, po zakończeniu reakcji rRT-PCR można produkty analizować na drodze elektroforezy żelowej, co również jest potwierdzeniem swoistości (patrz ryciny 3, 5).

Przechowywanie próbek w nieodpowiednich warunkach lub pobranie materiału do niewłaściwego pojemnika, np. zawierającego heparynę jako antykoagulant, stwarza ryzyko otrzymania fałszywie ujemnego wyniku. Jak wykazano, heparyna używana często jako związek zapobiegający wykrzepianiu krwi jest silnym inhibitorem reakcji PCR w próbkach (23). Również niewłaściwe przechowywanie, a w szczególności powtórne zamrożenie wcześniej rozmrożonej próbki powoduje degradację RNA, a jeżeli dotyczy próbki krwi pełnej - prowadzi do hemolizy erytrocytów i uwolnienia hemu - innego silnego inhibitora PCR (8, 24). Z tego powodu reakcja łańcuchowa polimerazy, choć bardzo czuła, jest równocześnie obciążona ryzykiem związanym z obecnością inhibitorów. Dlatego konieczne jest stosowanie kontroli endogennej reakcji - amplifikacji genu, który ma charakter konstytutywny i powinien ulegać ekspresji w każdej analizowanej próbce (np. gen beta-aktyny, gen dehydrogenazy 3-fosforanu gliceraldehydu (GAPDH), gen alfa-tubuliny itp.). Brak produktu PCR dla takiej kontroli kwestionuje wiarygodność uzyskanego wyniku, bo świadczy o możliwej obecności inhibitorów reakcji lub o błędzie popełnionym w procedurze. Standardowo (10, 25), detekcja wirusa zapalenia wątroby typu C prowadzona jest w próbkach surowicy krwi pacjenta. Tego typu próbki kliniczne pozbawione są komórek jądrzastych, stąd często nie występuje w nich dostateczna ilość komórkowego RNA do syntezy genu kontroli endogennej (np. GAPDH). W takim przypadku możliwe jest dodanie egzogennej matrycy do próbek na etapie ekstrakcji kwasów nukleinowych.

Optymalizowana przez nas metoda wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu C wykazuje próg czułości na poziomie ok. 100 kopii HCV w badanej próbce o objętości 25 µl. W rzeczywistości czułość metody zależeć będzie od wielu zmiennych, a szczególnie od ilości surowicy pacjenta użytej do ekstrakcji RNA, od objętości reakcji RT-PCR oraz od ilości matrycy (RNA) użytej do RT-PCR. Ponieważ próbki pochodzące z panelu QCMD z definicji nie mogą być stosowane jako referencyjne, a ich miano wirusa HCV podane jest w formie jednostek, a nie liczby kopii (IU/ml), konieczna jest dalsza walidacja czułości na podstawie odpowiednich standardów ilościowych HCV, np. Opti-Quant HCV RNA (Acrometrix). Wydaje się jednak, że uzyskanie dodatniego wyniku we wszystkich próbkach z panelu QCMD świadczy o osiągnięciu istotnego klinicznie zakresu czułości i metoda może mieć zastosowanie do okresowej, wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości analiz.

Sekwencje starterów oraz sondy molekularnej specyficznych dla HCV mogą być udostępnione na życzenie.

WNIOSKI

Autorzy demonstrują własną technikę wykrywania genomu wirusa zapalenia wątroby typu C poprzez RT-rPCR z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych, która stanowi alternatywę wobec dostępnych ilościowych systemów komercyjnych real-time PCR. Możliwe jest przeprowadzenie analizy na obecność genomu HCV i jednocześnie zastosowanie kontroli endogennej w jednej próbce (reakcji multipleksowej). Opracowana metoda może mieć zastosowanie w wewnątrzlaboratoryjnej ocenie jakości badań w odniesieniu do wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu C technikami NAT. Opisana technika pozwala na szybkie uzyskanie wyniku, przy czym stosunkowo łatwe jest zwiększenie liczby analiz. Wydaje się więc, że jej powszechne zastosowanie usprawniłoby znacznie wykrywalność nosicieli HCV, szczególnie przy badaniach przesiewowych. Należy też zwrócić uwagę, że istnieje możliwość dalszego rozwinięcia real time PCR do metody ilościowej, która pozwalałaby na ocenę liczby kopii HCV w surowicy nosicieli. Oczywiście znacznie zwiększyłoby to jej przydatność np. do monitorowania skuteczności terapii antywirusowej lub do celów epidemiologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Wojtyniak B, Goryński P (red.) Sytuacja zdrowotna ludności polski. Warszawa; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny: 2008.
2. Czarkowski MP, Cielebąk E, Kondej B, Staszewska E, Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2009 roku. Warszawa; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny: 2010.
3. Chlabicz S, Bonifatiuk I, Radziwon P. Prevalence of hepatitis C virus antibodies among blood donors in north-eastern Poland. *Hepatology Research* 2005; 33: 206-210.
4. Nettikadan SR, Johnson JC, Vengasandra SG i in. ViriChip: a solid phase assay for detection and Identification of viruses by atomic force microscopy. *Nanotechnology* 2004; 15: 383-389.
5. Maggiore G, Caprai S, Cerino A i in. Antibody-negative chronic hepatitis C virus infection in immunocompetent children. *J Pediatr* 1998, 132:1048-50.
6. Brojer E.; Gronowska A.; Medyńska J i in. The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative

- blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. *Transfusion* 2004, 44:1706-1710.
7. Brojer E, Grabarczyk P. Badania HCV, HBV i HIV technikami biologii molekularnej (NAT) i wyniki analizy polimorfizmu tych wirusów u krwiodawców. *Przeegl Epidemiol* 2008; 62: 495-496.
 8. Gessoni G, Barin P, Valverde S, i in. Biological qualification of blood units considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. *Transfus Apher Sci* 2004; 30: 197-203.
 9. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993; 74: 2391-2399.
 10. Martell M, Gomez J, Esteban JI, i in. High-throughput Real-Time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C Virus RNA *J Clin Microbiol* 1999; 37: 327-332.
 11. Yang J-H, Lai J-P, Douglas SD, i in. Real-time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods*. 2002; 102: 119-128.
 12. Young KKY, Resnick RM, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31(4): 882-886.
 13. Krajden M, Ziermann R, Khan A, i in. Qualitative detection of hepatitis C virus RNA: comparison of analytical sensitivity, clinical performance, and workflow of the Cobas Amplicor HCV Test version 2.0 and the HCV RNA transcription-mediated amplification qualitative assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8): 2903-2907.
 14. Zaaijer HL, Cuyper HTM, Reesink HW, i in. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 341: 722-724.
 15. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1), World Health Organization, 28.04.2009
 16. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 2000. 16(6): 276-277.
 17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.25-1.28.
 18. Pattyn F, Speleman F, De Paepe A, i in. RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 122-123. (<http://www.rtpimerdb.org>)
 19. Kelly GL, Milner AE, Baldwin GS, i in. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *PNAS* 2006; 103(40): 14935-14940.
 20. Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA: Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence- implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 2004; 73:65-70.
 21. Nozaki A, Naganuma A, Tanaka K i in.: A reliable internally controlled RT-nested PCR method for the detection of hepatitis C virus RNA. *Acta Med Okayama* 2000; 54: 253-257.
 22. Fryer JF, Baylis SA, Gottlieb AL i in. Development of working reference materials for clinical virology. *J Clin Virol ESCV Snapshot Special Issue, ESCV meeting; 2008; 43: 367-371.*
 23. Wang J-T, Wang T-H, Sheu J-C i in. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 750-753.
 24. Akane A., Matsubara H., Nakamura H. i in. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Forensic Sci* 1994; 39: 362-372.
 25. Halfon P, Bourlière M, Pénaranda G i in. Real-Time PCR assays for hepatitis C virus (HCV) RNA quantitation are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection. *J Clin Microbiol* 2006. 44(7): 2507-2511.
- Otrzymano: 15.12.2010 r.
Zaakceptowano do druku: 3.03.2011 r.
- Adres do korespondencji:**
Grzegorz Machnik,
Katedra Farmakologii, Klinika Chorób Wewnętrznych
i Farmakologii Klinicznej,
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Medyków 18, 40-752 Katowice
gmachnik@sum.edu.pl,
tel. (32) 208 35 17