

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Využití molekulárně biologických metod při diagnostice cytomegaloviru (CMV)

bakalářská práce

Autor práce: Erika Šimerová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant – kombinované studium
Vedoucí práce: Ing. Natalja Piskunova, CSc.

Datum odevzdání práce:

ABSTRAKT

Lidský cytomegalovirus (HCMV nebo CMV) je lidský virový patogen ze skupiny herpetických virů, které se nacházejí v rozvinutých i méně rozvinutých společnostech a u všech věkových skupin. Může se přenášet krví, močí, cervikální a vaginální exkrecí, spermatem, mateřským mlékem, slzami a stolicí. Nakažení jednotlivci mohou virus přechodně vylučovat s tělesnými tekutinami, a tak nakazit ostatní. Imunokompromitovaní jedinci, pacienti po transplantaci, pacienti s AIDS a novorozenci mají vyšší riziko vývoje vážných CMV infekcí, které mohou vést k výrazně vyšší nemocnosti a úmrtnosti. Vážné klinické symptomy CMV choroby zahrnují CMV syndrom, retinitidu, gastroenteritidu, hepatitidu, encefalitidu, ezofagitidu, enterokolitidu, pankreatitidu a pneumonii. Z toho důvodu je důležité včasné stanovení CMV infekce. **(1,8,32)**

Virologická diagnostika cytomegalovirových infekcí je založena na průkazu specifických protilátek třídy IgM a IgG nebo na kultivaci na tkáňových kulturách. Vzhledem k závažnosti systémových infekcí cytomegalovirem a nutnosti rychlého zahájení léčby je včasný průkaz virové DNA v klinickém materiálu nezbytný. **(9)**

K přímému průkazu se nyní častěji využívají molekulárně biologické metody - metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro detekci PCR je třeba nejprve z klinického materiálu vyizolovat virovou DNA. Virovou DNA lze získat z různých klinických materiálů, např. z mozkomíšního moku, z krve, z krevní plazmy, z tkání, moče, mateřského mléka, z punktátů a také ze stěrů z různých ložisek a sliznic.

V této práci bylo porovnáváno kvalitativní stanovení DNA CMV pomocí dvou metod PCR. Jednou z nich byla in house metoda. Zde se pomocí nested PCR se dvěma páry specifických primerů amplifikují úseky virové DNA CMV, které jsou následně detekovány na agarózovém gelu. Vizualizace takto získaných produktů PCR na agarózovém gelu se děje za pomoci interkalačního činidla – ethidium bromidu. Tato metoda je velmi citlivá, ale časově náročná. **(25,30)**

Jako druhá metoda pro kvalitativní stanovení DNA CMV byla použita metoda real-time PCR na přístroji Rotor Gene. Detekce probíhá v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázána na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou na PCR amplifikát. Detekce PCR produktů je prováděna na základě intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase. Systém je zároveň schopen identifikovat potenciální PCR inhibici za přítomnosti interní kontroly. Tato metoda se jeví jako časově výhodnější, proto byla zavedena jako běžně užívaná metoda

pro kvalitativní stanovení DNA CMV. Metody nested PCR a real-time PCR mají srovnatelnou citlivost a jsou srovnatelné i po finanční stránce.

Pro jejich srovnání bylo použito 150 vzorků krve a krevní plazmy od 75 jedinců. Záchyt DNA CMV byl srovnatelný. Jen v jednom případě nebyl zachycen pozitivní výsledek u metody real-time na přístroji Rotor Gene, zatímco metoda nested PCR jej zachytila. I tak se metoda real-time PCR jeví jako velmi výhodná metoda pro kvalitativní stanovení DNA CMV a to i díky používání interních kontrol.

U pacientů po transplantacích, u novorozenců, u onkohematologických pacientů je třeba kvůli léčbě provádět kvantitativní stanovení DNA CMV. V této práci byla pro kvantitativní stanovení používána metoda real-time PCR na přístroji Light Cycler. CMV LC Master obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci 105bp dlouhého úseku genomu CMV a také pro bezprostřední detekci amplifikátu pomocí přístroje Light Cycler. I zde se nachází amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice založený na detekci interní kontroly. Analytický limit detekce přitom není negativně ovlivněn. Množství CMV viru ve vzorku se určuje pomocí kvantifikovaných standardů, které jsou součástí kitu. Analyzátor vypočítává titr virové DNA v testovaných vzorcích porovnáním signálu u každého vzorku se signálem kvantitativního standardu, jenž je přiřazen ke kalibrační křivce daného balení kitu. Kvantitativní stanovení se pak uvádí v množství kopií/1 ml vzorku. Právě na základě monitorinku kvantitativního stanovení se u pacientů určuje délka léčby CMV infekce. **(21,30)**

Izolace DNA lze provádět ručně nebo pomocí automatických přístrojů – izolátorů. Ve své práci jsem se zaměřila na srovnání těchto dvou odlišných izolací. Ruční izolaci jsem prováděla pomocí izolačního QIAmp DNA Mini Kitu od firmy QIAGEN. Automatizovanou izolaci jsem prováděla na izolátoru MagCore za použití MagCore Genomic DNA whole Blood Kitu (RBCBioscience). Pro srovnání obou izolací byly současně použity jako klinické materiály krev a krevní plazma vždy od stejného jedince. Obě metody izolací pak byly následně použity pro kvalitativní i kvantitativní stanovení CMV DNA. Z výsledků kvantitativních stanovení vyplývá, že obě použité izolace jsou srovnatelné, tzn. lze použít obě izolace se stejným kvantitativním výsledkem.

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV or CMV) is a human viral pathogen from a group of herpetic viruses. This group is world-spread in all communities, not only with lower living standards, and in all age groups. It can be transferred by blood, urine, cervical or vaginal excretion, sperm, breast milk, tears and feces. Infected individuals can temporarily excrete the virus through the body fluids and infect the others. Immunocompromised persons, including neonates, patients after transplantation and patients infected by the AIDS, have a bigger chance to evolve a serious CMV infection which can rapidly increase the illness or cause the death. Serious clinical symptoms of CMV infection include CMV syndrome, retinitis, gastroenteritis, hepatitis, encephalitis, esophagitis, enterocolitis, pancreatitis and pneumonia. For that reason, the early establishment of CMV infection is very important. **(1,8,32)**

Diagnostics of cytomegalovirus infections is based on proofing the specific antibodies of the groups of IgM and IgG or cultivation of tissue cultures. Because of the weightiness of system infections caused by CMV and the necessity of a quick start of the cure, the well-timed evidence of viral DNA in clinical material is necessary. **(9)**

To a direct evidence it is more often to use the methods of molecular biology - polymerase chain reaction (PCR). To detect the PCR, at first we need to isolate viral DNA from clinical material. We can get it by various biological materials such as blood, plasma, tissues, urine, breast milk, etc.

Isolation of DNA can be done manually or with the automatic machines - isolators. In my work I concentrated to compare these two different isolations. I did manual isolation with the help of impervious QIAamp DNA Mini Kit made by QIAGEN and automatic isolation with isolator MagCore using MagCore Genomic whole Blood Kit (RBCBioscience). To compare the isolations blood and plasma were used as clinical materials and their origin was the same. Both methods were used afterwards to set up the qualitative and comparative CMV DNA. The result means that both isolations are comparable - both can be used with the same quantitative result.

In this work there is also compared the qualitative determination of DNA CMV by using two PCR methods. One of them was the "In house" method in which are two sections of viral DNA CMV amplified by the couples of specific primers and later there are detected by the agarose gel. Visualisation of these products on agarose gel is going on with the help of intercalating reagent - ethidium bromide. This method is very sensible but it takes a lot of time. **(25,30)**

As the second method for qualitative determination of DNA CMV I did the real-time method using the Rotor Gene machine. Detection wages in real time thanks fluorescent colorants. Colorants are often bounded in oligonucleotic probes, which are bounding specifically in PCR amplificate. Detection of PCR products is done on a base of fluorescent intensity during the PCR in real time. System is also able to identify the potential PCR inhibition and it is also able to do the internal control. This method looks like better because it takes less time. That is the reason why it is used commonly to determine the qualitative DNA CMV.

Nested PCR and real-time PCR methods are even comparable financially. For their comparison, there were used 150 samples of blood and plasma from 75 persons. The incidence of DNA CMV was comparable. Only in one case there was not positive result in the real-time method with Rotor Gene machine while the nested method caught it. Despite this fact, the real-time method seems to be very good for qualitative determination of DNA CMV even thanks to internal controls.

It is necessary to do the quantitative determination of DNA CMV at the patients after transplantations, neonates and oncohematological patients. In this work I used for quantitative determination real-time PCR method with Light Cycler machine. CMV LC Master contains reagentions and enzymes for specific amplification of 105bp long part of CMV genome and for direct detection of amplificate using the Light Cycler machine. Here is also located the amplification system to evidence the potential inhibition of PCR based on detection of the internal control. Analytical limit of the detection is not affected negatively. The quantity of CMV virus in the sample is determined by quantificated standard which is a part of a the kit. Analyser counts titer of viral DNA in tested samples using the comparison of signal in each sample with the signal of quantitative standard which is assigned to the calibration curve of the kit. Quantitative determination is later cited as a number of copies in 1ml of sample. Just on the base of monitoring of quantitative determination it is set the length of the cure of CMV infection to patients. **(21,30)**

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu laboratoře molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice a.s. za vytvoření vhodných podmínek a umožnění výzkumu k mé bakalářské práci. Zejména bych chtěla poděkovat vedoucí práce, paní Ing. Natalji Piskunové, Csc, za její praktické zkušenosti a teoretické znalosti a také panu Mgr. Pavlu Trubačovi. Oběma bych chtěla poděkovat za čas, který mi byli ochotni věnovat.

Obsah

Úvod	10
1. Současný stav	12
1.1 Cytomegalovirus (CMV)	12
1.1.1 Vlastnosti virionu.	12
1.1.2 Množení CMV	12
1.1.3 Životní cyklus	13
1.1.4 Genom	13
1.1.5 Exprese genomu	13
1.2 Cytomegalovirová infekce	14
1.2.1 Příznaky cytomegalovirové infekce	14
1.2.2 Prevence cytomegalovirové infekce	15
1.2.3 Léčba cytomegalovirové infekce	15
1.3 Diagnostika	16
1.3.1 Diagnostika pomocí serologie	16
1.3.2 Diagnostika metodami PCR	17
2. Cíle práce	18
2.1 Hypotézy	18
3. Metodika	19
3.1 Struktura a vybavení laboratoře	19
3.1.1 Izolační místnost	19
3.1.2 Místnost pro přípravu reakčních směsí – Master mix	20
3.1.3 Laboratoř PCR	20
3.1.4 Laboratoř pro nested PCR	21
3.1.5 ELFO laboratoř	21
3.2 Použité metody izolací DNA CMV:	22
3.2.1 Manuální izolace DNA CMV	22
3.2.2 Izolace DNA CMV pomocí izolátoru MagCore za použití MagCore Genomic DNA Whole Blood Kitu (RBCBioscience)	23

3.3 PCR	26
3.3.1 Obecná charakteristika PCR	26
3.4 Kvalitativní stanovení DNA CMV	27
3.4.1 Metoda nested PCR.....	27
3.4.2. Real Time PCR na přístroji Rotor Gene.....	32
3.5 Kvantitativní stanovení DNA CMV.....	33
4. Výsledky	38
4.1 Zavedení metody Real-time PCR pro kvalitativní stanovení DNA CMV	38
4.2 Kvantitativní hodnocení	42
4.2.1 Využití kvantitativního stanovení DNA CMV.....	44
4.3 Srovnání výtěžnosti DNA CMV u dvou způsobů izolací.....	45
4.4 Vyhodnocení vzorků DNA CMV v letech 2011 a 2012	46
5. Diskuze	48
6. Závěr.....	50
7. Seznam použité literatury	52
8. Klíčová slova	56
9. Seznam zkratk	56

Úvod

Téma bakalářské práce: Využití molekulárně biologických metod při diagnostice cytomegaloviru (CMV)

Cytomegalovirus patří do skupiny herpetických virů. Viry této skupiny mají jednu podobnou vlastnost – po primární infekci zůstanou přítomné v těle a projeví se znovu při oslabení imunity (tzv. latentní infekce). Cytomegalovirus se po primární infekci nejintenzivněji množí především ve slinných žlázách, ledvinách a bílých krvinkách, kde nukleová kyselina viru a tím i genetická informace (genom) zůstává po celý další život. **(2)**

Lidský cytomegalovirus je celosvětově rozšířený virus, který je všudypřítomný, mezi lidmi koluje a populace je jím z velké části promořena. Promořenost světové populace kolísá od 50% ve vyspělých státech po téměř 100% ve státech rozvojových, kde je vysoká hustota obyvatel a horší hygienické podmínky. Vysoká promořenost populace znamená, že lidé mají proti tomuto viru vytvořené protilátky a jsou proti němu odolní. Protilátky se vytvoří při prodělání primární infekce (při prvním setkání s virem), která probíhá u většiny lidí bezpříznakově. U primoinfekce se vyskytuje syndrom infekční mononukleózy, horečnaté onemocnění s lymfadenitidou, hepatitida (hlavně u kojenců), závažná vrozená infekce (mikrocefalie, slepota, hepatomegalie, purpura), vzácně se může objevit pneumonie, kolitida, meningitida. Jakmile však dojde k tomuto rozšíření viru v organismu, aktivuje se imunitní systém a leukocyty začnou tvořit protilátky. Taková je situace u jedinců se zdravým imunitním systémem. Problém nastává u osob s imunitní nedostatečností, těhotných žen a novorozenců. **(32)**

Velmi nebezpečné jsou infekce těhotných žen, které mohou vést k transplacentárnímu přenosu viru na plod nebo k perinatální nákaze novorozence. Infekce u vyvíjejícího se plodu bývá doprovázena zvětšením jater, zvětšením sleziny nebo hepatitidou, což může vést až ke smrti plodu. Po porodu se vyskytuje u novorozenců hluchota, poškození zraku a mentální retardace. Rizikovým faktorem je závažné oslabení imunitního systému. U imunosupresivních pacientů jde o obvykle o reaktivaci latentního viru. CMV u těchto pacientů způsobuje obávané, často smrtelné komplikace, které se mohou projevit po transplantacích, u nádorově nemocných, v průběhu léčby cytostatiky a u nemocných AIDS. **(8)**

Laboratorní výběr testu se liší podle situace.

Mezi rychlé metody CMV patří :

- Průkaz antigenu a mikroskopie – tyto metody jsou málo citlivé a zastaralé.
- Průkaz nukleové kyseliny (PCR) – tato metoda je rychlá a spolehlivá, kvalitativní i kvantitativní a citlivější než kultivace. Kvantitativní stanovení se používá při sledování účinnosti léčby.

Jako nepřímý průkaz se provádí stanovení protilátek. Stanovení specifických IgG, IgM, případně IgA. IgG jsou anamnestické, pro diagnostiku reaktivace mají malý význam, lze stanovit aviditu IgG. IgM a IgA jsou u akutních infekcí i reaktivací. Jsou popisovány nespecifické reakce. Protilátky neznačí imunitu.

U serologie se dobře pozná primární infekce, nepozná se reaktivace. Naopak u přímého průkazu nerozlišíme, zda se jedná o primární infekci nebo reaktivaci.

1. Současný stav

1.1 Cytomegalovirus (CMV)

Cytomegalovirus patří do čeledi Betaherpesvirinae. Betaherpesvirinae se množí relativně pomalu. Jejich replikační cyklus trvá nejméně 24 hodin. Čeď Betaherpesvirinae zahrnuje tři rody: Cytomegalovirus, dále Muromegalovirus, obsahující pouze myší cytomegalovirus (slouží jako důležitý model lidských cytomegalovirových infekcí), a Roseolovirus s lidskými herpesviry 6 a 7. **(24)**

Jediným druhem rodu Cytomegalovirus je lidský cytomegalovirus (označovaný též jako CMV, nebo Human herpes 5 cytomegalovirus). Infikované buňky se zvětšují a obsahují typické intranukleární cytomegalické inkluze. Vychází se z histologického obrazu infekce – tvorba obrovských vícejaderných buněk. Jako ostatní herpesviry i CMV po primární infekci perzistuje a může se aktivovat. **(32)**

1.1.1 Vlastnosti virionu.

Stavba virionu je podobná jako stavba ostatních herpesvirů. Genom CMV je největší ze všech herpesvirů (240 000 párů bází). Je velmi podobný genomu HSV-1 a obsahuje velký počet opakovaných sekvencí. Ve virionu bylo zatím popsáno na 30 různých bílkovin, mnohdy dosti homologních s odpovídajícími proteiny jiných herpesvirů. Důležité jsou hlavní kapsidový protein MCP, hlavní obalový glykoprotein gB a tegumentové fosfoproteiny pp65 a pp150 využívané v diagnostice. O všech kmenech lidského CMV se soudí, že patří k jedinému antigennímu typu. CMV je velmi choulostivý. Musí se uchovávat při -70°C. Při pouhých -20°C není stálý. **(32,33)**

1.1.2 Množení CMV

Cytomegalovirus se množí pomalu. Jeho cyklus trvá 48 až 72 hodin, kratší je v aktivně se dělicích buňkách. Na rozdíl od jiných herpesvirů CMV nezastavuje buněčný metabolismus, spíše ho stimuluje. In vitro se nejlépe množí v primárních kulturách lidských fibroblastů z kůže nebo plic. Jeho adsorpci a penetraci zřetelně usnadňuje centrifugace virového inokula na tkáňovou kulturu. In vivo se CMV nejlépe množí v epitelálních buňkách vývodů slinných žláz a ledvinných tubulů. Nové

nukleokapsidy nahromaděné v buněčném jádře jsou podstatou typických inkluzí vzhledu soviho oka. (32)

1.1.3 Životní cyklus.

CMV vstupuje do těla sliznicí respiračního, zažívacího nebo urogenitálního traktu a v první fázi generalizace hraje roli virémie. Primární infekce bývá inaparentní a virus po ní přetrvává v buňkách slinných žláz a ledvinových kanálků, vylučuje se intermitentně slinou a močí. Posléze imunita dostane produktivní infekci pod kontrolu. Důležitější je v tom imunita buněčná než protilátková. Po likvidaci produktivní infekce virus persistuje především v ledvinových tubulech a slinných žlázách, částečně v polymorfonukleárních leukocytech. Aktivace latentní infekce je za normální situace rovněž klinicky němá a projeví se jen krátkodobým vylučováním viru. Kongenitální infekce je generalizovaná, postižena jsou hlavně játra a mozek, a perzistentní, virus se vylučuje slinou a močí i několik let. (1,31)

1.1.4 Genom

Genom je nesegmentovaná, lineární dvoušroubovicová DNA o délce 200 kb obsahující ukončující a vnitřní repetitivní sekvence. (25)

1.1.5 Exprese genomu

Exprese genomu všech herpesvirů je poměrně málo závislá na enzymech hostitelské buňky, jelikož řada enzymů katalyzujících syntézu DNA herpesvirů a nukleotidů je kódována jejich genomem. Jeho transkripce se vytvoří alespoň 50 různých proteinů. Transkripce je katalyzována RNA-polymerázou II hostitelské buňky. Regulace genové exprese je koordinačně regulována. (25)

1.2 Cytomegalovirová infekce

Jak jsem již zmínila, jedná se o velmi častou virovou infekci. Lidský cytomegalovirus je rozšířen po celém světě. V lidské populaci se udržuje v latentní fázi, odhaduje se, že 50% - 80% populace je tímto virem promořena. U většiny se příznaky projeví v dětství. Příznaky mohou být různé, může se projevit infekční mononukleóza spojená s horečkou a hepatitidou.

1.2.1 Příznaky cytomegalovirové infekce

Jak bylo již předesláno, infekce u zdravých lidí probíhá většinou bez klinických příznaků, protože zdravý imunitní systém si s virem poměrně snadno poradí. Jiná je situace jeho oslabení. Týká se to především transplantací orgánů a onemocnění AIDS.
(12)

Přenos nákazy transfuzí nebo latentně infikovaným štěpem (ledvina, kostní dřeň), nebo aktivace latentní infekce při terapii imunosupresivou vede často k vážným komplikacím klinického stavu nemocných po transplantaci. Může se objevit horečka, známky infekční mononukleózy nebo poruch jaterních funkcí. Cytomegalovirové infekce po transplantacích jsou odlišné u příjemců orgánových štěpů a příjemců kostní dřeně. U příjemců ledvin, srdce a jater dochází k přenosu infekce v závislosti na sérologickém stavu dárce a příjemce a na stupni imunosuprese v 60 až 100%. Zdrojem je obvykle aktivace latentní infekce, vzácnější a závažnější je přenos transplantovanými orgány. Infekce může probíhat jako invazivní onemocnění s těžkým postižením gastrointestinálního traktu, jater nebo plic. Velmi nebezpečná je CMV infekce u příjemců alogenní kostní dřeně. Zdrojem virů jsou spíše dlouhodobě podávané krevní produkty než transplantovaná dřeň. Nejzávažnějším syndromem u transplantovaných pacientů je nejčastěji septický průběh s postižením více orgánů. Může nastat i intersticiální cytomegalovirová pneumonie a cytomegalovirová kolitida.
(8)

U nemocných infikovaných HIV je CMV jednou z nejčastějších komplikací (hlavně retinitida, kolitida, může být i pneumonie a encefalitida). Většina pacientů s rozvinutým AIDS vykazuje známky aktivní CMV infekce a je zcela zřejmý vztah mezi invazivní CMV infekcí a časným úmrtím při AIDS.

Nejzávažnější je primární infekce v době těhotenství, zejména v době prvního trimestru. Ve více než 10% případů může způsobit vážná poškození plodu. Infekce plodu se nazývá tzv. vrozená kongenitální infekce. Pokud se výskyt potvrdí, doporučuje se ukončení těhotenství. Vrozená infekce se totiž může projevit odumřením plodu, vznikem vrozených vad mozku, srdce či oka, poškození sluchu psychomotorickou retardací (celkové zpomalení vývoje). Dále celkovou infekcí novorozence, která má za následek nízkou porodní hmotnost, žloutenku, chudokrevnost, krvácivé projevy, zvětšení jater a sleziny, zánět plic. Alarmující jsou výsledky nedávných studií, které prokázaly, že asi třetina žen u nás nemá proti cytomegaloviru vytvořené protilátky, a proto u nich hrozí výše popsaná rizika. (26)

Dalším závažným problémem je cytomegalovirová infekce v době těhotenství. Někdy dochází během těhotenství, nejčastěji v posledním trimestru, k aktivaci latentní infekce a tím často i k nakažení plodu během porodu. U zdravých donošených dětí nejčastěji proběhne infekce bezpříznakově. U dětí nedonošených nebo s poruchou imunity může však způsobit různá onemocnění, například zápal plic, zánět trávicího traktu či septické onemocnění (těžké systémové projevy). Naštěstí při reaktivované latentní infekci je pravděpodobnost postižení plodu relativně malá – asi 1%.

1.2.2 Prevence cytomegalovirové infekce

Prevenčí je dodržování standartních hygienických zásad, vyšetřování dárců krve a orgánů k transplantaci a vyloučit z dárcovství infikované dárce především u neimunních příjemců. Těhotné ženě s primární cytomegalovirovou infekcí se doporučuje přerušeni gravidity. (25)

1.2.3 Léčba cytomegalovirové infekce

Cytomegalovirové infekce u zdravých jedinců většinou nevyžadují žádnou léčbu, léčí se jen eventuální příznaky, jako u jiných viróz. U oslabených jedinců se používají antivirotika, nejčastěji ganciclovir. Dalšími léky mohou být foskarnet nebo cidofovir. Léčba je důležitá zejména u pacientů po transplantacích. V těchto případech je důležitá kvantitativní diagnostika CMV a sledování odezvy na léčbu vzhledem k toxicitě používaných antivirotik. Očkování zatím není, probíhají studie a vakcíny jsou ve fázi vývoje. (8,26)

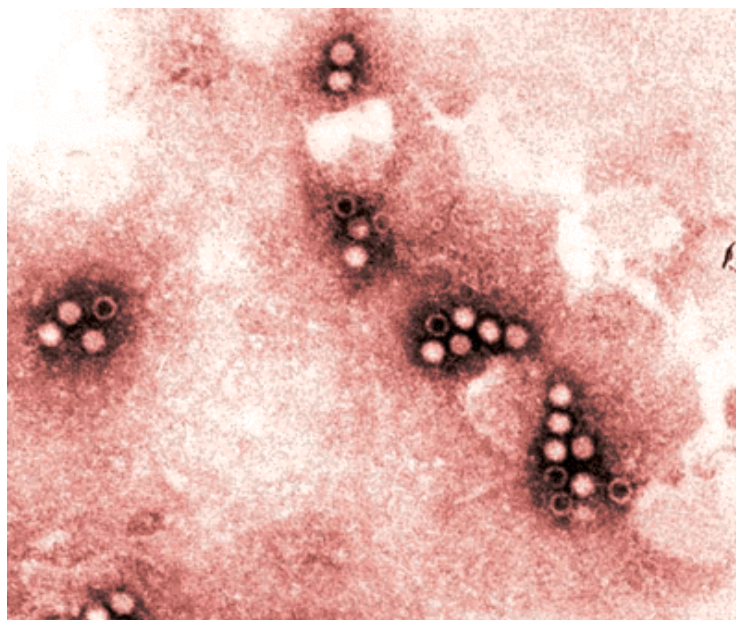
1.3 Diagnostika

1.3.1 Diagnostika pomocí serologie

Diagnostika CMV infekce – posouzení stavu imunity. Stanovují se IgG protilátky proti antigenu CMV v lidském séru. Metoda je založena na principu ELISA. Hladina CMV IgG protilátek se stanovuje podle poměru mezi hodnotou optické denzity vzorku a cut-off nebo podle kalibrační křivky sestavené podle kalibrátorů. IgG protilátky lze vyjádřit v jednotkách AU/ml (arbitrážní jednotky) nebo IU/ml (mezinárodní jednotky). **(9)**

Další diagnostika aktivní infekce CMV – stanovení IgM protilátek proti antigenu CMV v lidském séru. Tato metoda je založena na principu ELISA typu „capture“. Přítomnost nebo nepřítomnost specifických CMV IgM protilátek se stanovuje porovnáním hodnoty absorbance vzorku s hodnotou cut-off. Většinou svědčí pro aktivní infekci. **(9)**

Průkaz CMV na tkáňových kulturách – metoda založená na kultivaci na buňkách. Viry rostou s typickým cytopatickým efektem. Je možné identifikovat virus obarvením monoklonální protilátkou. **(3,12)**



Obr. č. 1: Mikroskopie CMV na tkáňových kulturách zdroj: imuni.cz

1.3.2 Diagnostika metodami PCR

Jednou z metod používaných ke kvalitativnímu stanovení DNA CMV v klinickém materiálu v laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice, a.s., je metoda nested PCR – k průkazu CMV se používá in house metoda, kdy se pomocí nested PCR (též „dvojitá PCR“) se dvěma páry specifických primerů amplifikují úseky virové DNA, které jsou následně detekovány na agarózovém gelu v elektroforéze. **(16,28)**

Kvalitativní stanovení DNA CMV pomocí Real Time PCR na přístroji Rotor Gene – pomocí specifických primerů a specifických fluorescenčních sond dochází k amplifikaci specifického úseku DNA a bezprostřední detekci amplikonu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q.

Kvantitativní stanovení DNA CMV metodou Real Time na přístroji LightCycler. Kvantitativní hodnocení se uvádí v množství kopií/ml vzorku (např. krevní plazmy). Jedná se o variantu PCR, která umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce. LightCycler umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky fluorescence během každého cyklu. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Používané substráty lze zařadit do dvou skupin: 1.nespecifické – nespecificky se vážou na dvouvláknovou DNA – typicky SYBR Green, 2.specifické – sondy – ve své struktuře mají oligonukleotidový řetězec, kterým se hybridizují k PCR amplikonu. Pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor – F nebo R) a zhasičem (quencher – Q). Nárůst fluorescenční aktivity je způsoben zvýšením vzdálenosti mezi molekulou R a Q po rozštěpení navázané sondy polymerázou. **(19,30)**

Metody PCR budou blíže popsány v metodice bakalářské práce.

2. Cíle práce

- Zavedení metody Real-time PCR pro rutinní kvalitativní a kvantitativní diagnostiku v klinických materiálech
- Porovnání metod izolací DNA CMV mezi manuální izolací a izolací pomocí automatických izolačních přístrojů

2.1 Hypotézy

Předpokládám, že rozdíly mezi manuální izolací DNA CMV a izolací automatickou na izolátoru MagCore budou srovnatelné.

3. Metodika

3.1 Struktura a vybavení laboratoře

Pro PCR diagnostiku je nezbytné funkční členění pracoviště (jednotlivých laboratorních místností), aby se zabránilo kontaminaci vzorků a tím se předešlo případným falešně pozitivním výsledkům.

3.1.1 Izolační místnost

Zde dochází k příjmu materiálu, jeho zaevidování do databáze a případnému uchování před jeho zpracováním. V izolační místnosti probíhá izolace virové DNA.

3.1.1.1 Vybavení laboratoře (Izolační místnost):

- 2 boxy s laminárním prouděním vzduchu a HEPA filtry – zde se manipuluje se vzorky a provádí se manuální izolace virové DNA.
- Dalším nezbytným vybavením laboratoře je AccuBlock – Dry block od firmy Labnet (2ks). Jedná se o termostat se širokým teplotním rozsahem (až do 150°C). Požadovaná hodnota se nastavuje pomocí šipek a její hodnoty se zobrazují na digitálním displeji. Uvnitř bloku dochází k rovnoměrnému rozložení teploty, takže všechny vzorky jsou vystaveny stejné teplotě, bez rozdílů jejich umístění v dry blocku. Block je pro max. 24 vzorků.
- Centrifuga – velká stolní odstředivka s rotorem určená ke stáčení zkumavek s odebranou krví získání krevní plazmy.
- Centrifuga – malá stolní centrifuga určená pro mikrozkušavky – eppendorfký. Má aktivní chlazení a max. nastavitelnou rychlost otáček až na 25 000g.
- Vortex – slouží k protřepání a promíchání vzorků
- Mikrozkušavky - sterilní
- Pipety – Pasteurovy (plastové) – sterilní
- Mikropipety – rozdělené k použití zvlášť na vzorky a zvlášť na roztoky – o objemech 0,5 - 5 μ l, 1 – 10 μ l, 2 – 20 μ l, 10 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l.
- Sterilní špičky s filtrem k mikropipetám

- Stojánky na zkumavky a mikrozkušavky
- Rukavice – latexové bez pudru
- Izolační kity

3.1.2 Místnost pro přípravu reakčních směsí – Master mix

Jedná se o místnost, kde se připravují reagenční směsi – master mixy. Jde o sterilní místnost, kam nesmí v žádném případě přijít materiál, izolát nebo produkt PCR.

3.1.2.1 Vybavení laboratoře pro Master mix:

- PCR boxy
- Mikrocentrifuga
- Vortex
- Mikropipety
- Mikrozkušavky (o objemu 200 μ l a 500 μ l)
- Sterilní špičky s filtrem
- Chladicí stojánky
- Rukavice bez pudru
- Chladicí a mrazicí zařízení pro uchování reagenčních činidel

3.1.3 Laboratoř PCR

Jde o místnost, ve které probíhá amplifikace PCR.

3.1.3.1 Vybavení laboratoře pro amplifikaci PCR:

- Thermocyclery
- Rotor Gene Q (od firmy QIAGEN) cycler pro RT-PCR a příslušný počítač se softwarem pro Rotor Gene Q

- LightCycler (od firmy ROCHE) a příslušný počítač se softwarem pro LightCycler
- Rukavice bez pudru
- Stojánky pro mikroskopické zkušební

3.1.4 Laboratoř pro nested PCR

Jedná se o tzv. přepichovací místnost. Zde se v boxu přepichují produkty z 1. PCR do připravených master mixů pro 2. PCR.

3.1.4.1 Vybavení nested laboratoře:

- PCR box (přepichovací)
- Mikropipeta na vzorky
- Mikropipeta na pozitivní kontroly
- Rukavice bez pudru

3.1.5 ELFO laboratoř

V této místnosti se provádí odečet PCR produktů pomocí elektroforézy.

3.1.5.1 Vybavení ELFO-laboratoře:

- ELFO vany – SCIE – PLAS
- Zdroje napětí se stejnosměrným proudem
- Digestoř
- Transluminátor – Biometra
- Přístroj k vyhodnocování výsledků – MiniBis
- 1xTBE pufr, agaróza, ethidium bromid – pro přípravu agarózového gelu
- Mikrovlnná trouba
- Rukavice bez pudru

3.2 Použité metody izolací DNA CMV:

1. Manuální izolace DNA CMV pomocí kitu QIAmp DNA Mini Kit (firma QIAGEN)
2. Izolace DNA CMV pomocí izolátoru MagCore (MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RCBioscience)).

3.2.1 Manuální izolace DNA CMV

3.2.1.1 Obsah izolačního kitu

Kit QIAmp DNA Mini Kit obsahuje tyto reagensie:

Ethanol (99%), roztok AW1, roztok AW2, roztok AE, roztok AL, proteinázu K.

Ethanol (99%) je připravován a dodán z lékárny Nemocnice Č. B. Pufr AW1 se připraví smícháním s požadovaným množstvím ethanolu (99%) – dáno výrobcem a je skladován při laboratorní teplotě. Taktéž pufr AW2 se smíchá s požadovaným množstvím ethanolu (99%) – dáno výrobcem a skladuje se při laboratorní teplotě. AE je připraven přímo k použití, skladuje se při pokojové teplotě. Proteináza K se musí rozaliquvovat po menších množstvích a je nutné ji zamrazit, tedy uchovávat při zhruba -20°C.

3.2.1.2 Postup práce při manuální izolaci

Cytomegalovirus jsem izolovala z těchto klinických materiálů: plná krev, plazma, mozkomíšni mok, moč, mateřské mléko, biopsie, sputum, stěr.

Pro srovnání izolací jsem použila zejména nesrážlivou krev s přídavkem EDTA a krevní plazmu.

Krev po přijetí do laboratoře a následném zapsání do databáze je inkubována ve vertikální poloze ve stojánku při laboratorní teplotě zhruba 30 minut. Poté je odebrán vzorek horní frakce s leukocyty minimálně 200µl do sterilních 1,5ml zkumavek eppendorfek označených jménem pacienta a identifikačním číslem pacienta. Zbytek vzorku v původní zkumavce je centrifugován při 2500 x g a získaná plazma je odebrána rovněž do 1,5ml zkumavek eppendorfek označených jménem a identifikačním číslem pacienta. Vzorky jsou pak uchovány v mrazicím boxu až do doby izolace DNA.

Před samotnou izolací je nutné vzorek z mrazicího boxu nechat rozmrazit a připravit stojánek se zkumavkami na jednotlivé reagentie. Pro izolaci jednoho vzorku se připravuje v tomto pořadí: 1,5ml zkumavka – sběrná zkumavka s kolonkou –1. sběrná zkumavka – 2. sběrná zkumavka – 1,5ml zkumavka eppendorfká. Poslední zkumavka se popíše číslem izolace, které se určí pomocí tzv. pracovního protokolu, jménem pacienta, identifikačním číslem pacienta.

Izolace se provádí v izolační místnosti v izolačním boxu.

Po rozmrazení se vzorky důkladně zvertexují (promíchají) a krátce stočí v centrifuze, aby nezůstával vzorek na víčku zkumavky. Zapne se suchá lázeň, nastaví na teplotu 56°C a nechá se vyhřát na požadovanou teplotu. Do první připravené prázdné zkumavky se napipetuje 20μl proteinázy K, přidá se 200μl vzorku a 200μl AL pufru. Vše se důkladně zvertexuje (min. 15s). Zkumavka se pak uloží do suché lázně, kde se nechá inkubovat 15 minut v 56°C. Po této době se provede krátká centrifugace. Do této zkumavky se pak přidá 200μl 99%ního ethanolu, opět důkladně (15s) zvertexuje, stočí v centrifuze a celý obsah zkumavky se opatrně přelije na kolonku. Pokud se vytvoří ve zkumavce usazenina, ponechává se v mikrozksamavce, aby se kolonka neucpala. Zkumavka s kolonkou se dále točí v centrifuze při 6000 x g po dobu jedné minuty. Po stočení se kolonka přendá do čisté 1. sběrné zkumavky a přidá se pipetou 500μl AW1 pufru, který je součástí izolačního kitu. Opět proběhne centrifugace 6000 x g po dobu jedné minuty. Kolonka se přendá do prázdné čisté 2. sběrné zkumavky a přidá se 500μl AW2 pufru. Centrifuguje se min. 13 000 x g 3 minuty. Poté se kolonka přemístí do sterilní 1,5ml mikrozksamavky a přidá se 100μl AE pufru (tzv. Elution buffer) a nechá inkubovat cca 3 minuty při pokojové teplotě. Centrifuguje se 6000 x g / 1 min.. Po stočení se nachází v mikrozksamavce cca 100μl vyizolované DNA. Ta je připravena pro použití do PCR reakce. Takto vyizolovanou DNA lze uchovávat krátkou dobu v lednici, jinak je nutné ji uchovávat v mrazicím boxu (při chladničkové teplotě po delší dobu by mohla DNA degradovat). Hotový izolát lze použít pro jakoukoli metodu PCR, pro kvalitativní i kvantitativní vyšetření.

3.2.2 Izolace DNA CMV pomocí izolátoru MagCore za použití MagCore Genomic DNA Whole Blood Kitu (RBCBioscience)

Jedná se o automat, který pracuje na principu magnetické technologie k zachycení nukleové kyseliny.

Principy izolátorů :

Jde o metody k izolaci nukleových kyselin, které využívají magnetické (také paramagnetické) částice. Magnetické částice jsou kulovité útvary v rozmezí velikosti 5nm až 100 μ m, jejichž jádro je tvořeno magnetickými oxidy železa (magnetit, ferriy zlata, kobaltu, manganu a mědi). Povrch částic je dále modifikován tak, aby mohl vázat vlákna nukleových kyselin. Samotná izolace pak probíhá tak, že ke vzorku nukleových kyselin se přidají magnetické částice a cílené molekuly se na ně naváží. Poté se zkumavka přiblíží k působení magnetu, magnetické částice se přitáhnou ke stěně zkumavky a zbylý roztok s nenavázanými částicemi se odstraní. Následuje omývání a uvolnění nukleových kyselin z komplexu do námi přidaného roztoku. Magnetické částice jsou opouzdřeny látkou, která umožní navázání cílového objektu. Jedná se o anorganický oxid nebo organický polymer. Nejvíce se uplatňuje silika (SiO₂). (10,12)

3.2.2.1 Použité reagensie pro izolaci v izolátoru MagCore a jejich skladování

Předplněná cartridge, sterilní mikrozskumavky pro nandání vzorků, mikrozskumavky s víčkem na izolát, špičky s filtrem – vše je součástí Genomic DNA Whole Blood Kitu a skladuje se při laboratorní teplotě.

3.2.2.2 Pracovní postup při izolaci v izolátoru MagCore

Jako klinický materiál jsem opět používala zejména nesrážlivou krev s přídavkem EDTA a krevní plazmu, tedy stejný materiál jako u manuální izolace, abych mohla provést srovnání jednotlivých izolací.

Nejprve se nechá přístroj vysvítit UV světlem a rovněž po každém běhu izolace na izolátoru se provádí sterilizace UV světlem. Pokud jsou vzorky na izolaci zamrazené, necháme je úplně rozmrazit. Vyjmou se kovové stojánky z přístroje a vloží se do nich dle počtu izolací předplněná cartridge, Zkumavky na vzorky, špičky a zkumavky na izolát, které se popíše číslem izolace (dle pracovního protokolu), jménem a identifikačním číslem pacienta. Používají se cartridge s číselným označením 101.

V izolačním boxu se do připravených zkumavek sterilní pipetou odebere 200 μ l vzorku. Vše se umístí do přístroje a spustí příslušný program. Ten se volí stejným číslem, které je uvedeno na cartridge, v tomto případě program č. 101. Izolátor je schopen vyizolovat jeden až 16 vzorků současně. Izolace trvá celkem 45 minut bez ohledu na to, kolik vzorků se v izolátoru nachází. Po ukončení programu se vyjmou izobáty, které se uchovávají jeden den v lednici, po delší dobu v mrazícím boxu. Použité cartridge, špičky a zkumavky od vzorků se zlikvidují, přístroj se dezinfikuje a vysterilizuje UV světlem. Získaný izolát lze použít pro metody PCR, kvalitativní i kvantitativní stanovení.

Po izolaci DNA následuje reakce PCR.

3.3 PCR

3.3.1 Obecná charakteristika PCR

PCR pochází z anglického názvu Polymerase Chain Reaction a znamená polymerázová řetězová reakce. PCR byla vyvinuta v Cetus Corporation Emeryville v Kalifornii a v roce 1985 byla Kary B. Mullisem uvedena do praxe. Principem metody je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. **(16)**

PCR DNA spočívá v cyklickém opakování 3 kroků:

1. Denaturace
2. Hybridizace
3. Syntéza nového vlákna úseku DNA na základě komplementarity.

Denaturace. Každá typická PCR začíná tepelnou denaturací vzorků DNA na dva jednoduché řetězce při teplotě 95°C. Reakce je založena na schopnosti dvouvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat po jejím snížení za zachování pravidla komplementarity bází. Jestliže jsou známy nukleotidové sekvence na koncích určitého úseku DNA, je možné úsek amplifikovat pomocí této polymerázové řetězové reakce.

Hybridizace. Tato fáze spočívá v ochlazení vzorku na 30 až 65°C. Při této teplotě dochází k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Primery nebo-li startéry jsou synteticky připravené jednovláknové oligonukleotidy, které mají sekvenci komplementární k sekvencím na 3' konci obou vláken rozmnožovaného úseku. Skládají se z přibližně 20 nukleotidů. Primery jsou předem nasyntetizovány a jejich syntéza probíhá na plně automatizovaných přístrojích.

Syntéza nového vlákna úseku DNA na základě komplementarity. Jako základ pro syntézu nových vláken slouží právě primery. Aby bylo dostatek substrátu pro syntézu nových vláken, je v PCR reakci přítomno nadbytečné množství deoxynukleotidtrifosfátů. Syntézu nových vláken katalyzuje termostabilní DNA polymeráza. DNA polymeráza je enzym, který byl izolován z bakterie *Thermophilus aquaticus*, žijící ve vývěrech horkých minerálních pramenů. V molekulárně

biologických laboratořích je znám pod označením Taq-DNA-polymeráza. Tato polymeráza prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od konce 5' ke 3' konci při optimální teplotě 72°C, a zůstává aktivní i po zahřátí na 95°C, nutných k denaturaci. Když je syntéza obou vláken skončena, je zkumavka s PCR reakcí opět zahřátá na 95°C, aby došlo k denaturaci nově vytvořených DNA duplexů a celý cyklus začíná znovu.

Produkty PCR se nazývají amplikony a jsou to úseky definované délky, jejichž velikost se pohybuje obvykle v desítkách, stovkách či tisících párů bází (bp). Přítomnost amplikonů v reakční směsi se prokazuje obvykle stanovením jejich velikosti pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu PCR. **(16,28)**

3.4 Kvalitativní stanovení DNA CMV

3.4.1 Metoda nested PCR

Jednou z používaných metod k průkazu CMV je v laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice, a.s., in house metoda, kdy se pomocí nested PCR (též "dvojitá PCR") se dvěma páry specifických primerů amplifikují úseky virové DNA, které jsou následně detekovány na agarózovém gelu v elektroforéze. První dvojice PCR primerů se amplifikují, zmnožují fragment. Druhá dvojice primerů jsou tzv. vnořené primery (tzn. vnořené do prvního fragmentu). Ty se váží uvnitř prvního fragmentu PCR produktu. Ve druhém kole nested PCR se zvyšuje množství produktu tak, že jako vstupní templát se použije předamplifikovaný produkt z 1. PCR. Zvýší se tak citlivost, a použitím vnitřních primerů se zajistí větší specifita. **(30)**

1. PCR CMV

Sekvence primerů pro 1. PCR:

- CMV1 - TCC AAC ACC CAC AgT ACC CgT
- CMV2 - Cgg AAA CgA Tgg TgT AgT TCg **(27)**

3.4.1.1 Příprava master mixu pro 1. PCR

Provádí se v laboratoři pro master mixy v PCR boxu dle následující tabulky:

Tabulka č. 1: Schéma přípravy reakční směsi pro 1. PCR pro jeden vzorek

Reakční směs pro jeden vzorek	
Reagencie	množství [μ l]
PCR H ₂ O	13
BIOTOOLS dNTP's 2,5 mM	2
BIOTOOLS 10x buffer with MgCl ₂	2,5
Primer CMV1 (10 pM / μ l)	1
Primer CMV2 (10 pM / μ l)	1
BIOTOOLS DNA polymerase 1U / μ l	0,5

Směs se připravuje v chlazeném stojánku a rozplňuje se po 20 μ l do sterilních PCR mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Zkušavky se popisují číslem pacienta dle denního pipetovacího protokolu. Pro každý následující den se používá jiné barevné označení. Kromě master mixů pro daný počet vzorků se vždy míchá současně jedna reakční směs pro pozitivní kontrolu a reakční směs pro negativní kontrolu. Ty nám slouží jako interní kontrola kvality. Výsledky pozitivní kontroly a negativní kontroly se pak uvádí do protokolu. Do mikrozkušavek určených pro negativní kontrolu se v boxu v laboratoři pro master mix přidává dionizovaná voda (PCR grade). Mikrozkušavka s negativní kontrolou je v dané sérii vždy jako poslední v řadě. Takto připravená a rozplněná reakční směs je na chlazeném stojánku přenesena do izolační laboratoře, kde je v izolačním boxu přidáno 5 μ l vyizolované DNA vzorku a 5 μ l známé pozitivní DNA CMV, která slouží jako pozitivní kontrola. Je důležitá pro velikost fragmentů při odečítání po proběhnutí v elektroforéze.

Vlastní amplifikace probíhá v laboratoři PCR v termocycleru. Program pro 1.PCR probíhá dle následujícího teplotního profilu:

94°C 3 min 1x

92°C 1 min	} 35x
45°C 1 min	
72°C 1 min	

72°C 7 min 1x

10°C teplota pro uchování PCR fragmentů

Po ukončení 1. PCR je připraven reakční mix pro 2. PCR.

Sekvence primerů pro 2. PCR:

- CMV3 - gTC AAg gAT CAg Tgg CAC AgC
- CMV4 - gTA gCT ggC ATT gCg ATT ggT (27)

3.4.1.2 Příprava master mixu pro 2. PCR

Provádí se v laboratoři pro master mixy v PCR boxu dle následující tabulky:

Tabulka č. 2: Schéma přípravy reakční směsi pro 2. PCR

Reakční směs pro jeden vzorek	
Reagencie	množství [μl]
PCR H ₂ O	13
BIOTOOLS dNTP's 2,5 mM	2
BIOTOOLS 10x buffer with MgCl ₂	2,5
Primer CMV3 (10 pM / μ l)	1
Primer CMV4 (10 pM / μ l)	1
BIOTOOLS DNA polymerase 1U / μ l	0,5

Směs se opět připravuje na chlazeném stojánku a rozplňuje po 20 μ l do sterilních PCR mikrozkušavek o objemu 0,2ml.

V laboratoři pro nested PCR pak proběhne přepipetování produktů z 1.PCR do reakční směsi pro 2.PCR. Z 1.PCR se přidává 5 μ l vzorku do 2.PCR. Vloží se do termocycleru a spustí příslušný program pro 2.PCR CMV. Ten je v našem případě stejný jako u 1.PCR. Po ukončení programu v termocycleru jsou produkty PCR přeneseny do ELFO laboratoře, kde proběhne detekce na agarózovém gelu v elektroforéze.

3.4.1.3 Detekce a vyhodnocení

Detekce probíhá na základě separace fragmentů produktů PCR v agarózovém gelu v elektrickém poli v elektroforéze. K vizualizaci slouží fluorescence ethidium bromidu při osvětlení UV světlem. Ethidium bromid je interkalační činidlo, které se vtěsňuje mezi vlákna nukleových kyselin, a tím umožňuje fluorescenci DNA fragmentů.

Připravuje se 2% agarózový gel v TBE pufru. K jeho přípravě potřebujeme 1g agarózy a 50ml 1xTBE pufru. TBE pufr je připravován v nemocniční lékárně a jeho složení je: Tris, kyselina boritá, EDTA, H₂O, pH=8,0. Agarózu smícháme s pufrem ve skleněné baňce, řádně zamícháme a přikryje se skleněným sklíčkem. Poté se umístí do mikrovlnné trouby a nechá zahřát při 70% výkonu po dobu přibližně 2 minut. Agaróza se musí zcela rozpustit, aby se v gelu vytvořily hrudky a gel byl hladký. Gel se ochladí a v digestoři s ventilací se do něj přidají 2 kapky ethidium bromidu a krouživým pohybem se promíchá. Poněvadž je ethidium bromid karcinogenní látka, pracujeme v nitrilových rukavicích. Gel nalijeme rovnoměrně do ELFO vaničky olepené lepicí páskou a opatřené ELFO hřebeny pro vytvoření otvorů (jamek). Gel se nechá minimálně 30 minut ztuhnout. Po úplném ztuhnutí gelu se opatrně odstraní hřebeny. Vanička se ztuhlým gelem se přemístí do elektroforézy – do ELFO vany. Do vany se nalije 1x TBE pufr tak, aby gel byl řádně ponořen. Stejnoseměrný proud se pohybuje od záporného pólu ke kladnému pólu, proto je nutné umístit jamky v gelu k zápornému pólu. Do jamek se nanáší 12 μ l PCR produktu, který se smíchá s pufrem obsahujícím bromfenolovou modř a glycerol, včetně pozitivní a negativní kontroly. Tento pufr je velmi důležitý – svou hustotou udržuje vzorky na dně jamky a barvivo slouží k vizualizaci fragmentů DNA. Vana se uzavře víkem a zapne se zdroj napětí (120V),

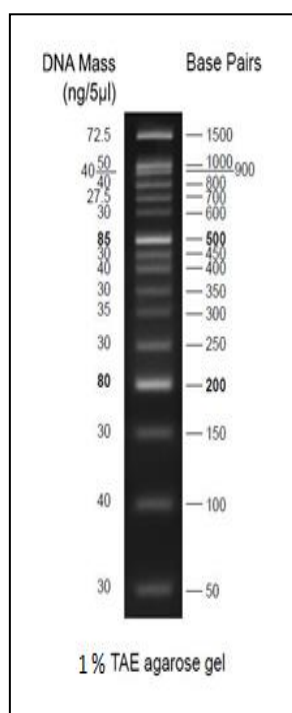
ke kterému je elektroforéza napojena. Zde běží stejnosměrný proud. Po 45 minutách až jedné hodině je elektroforéza vypnuta a gel opatrně vyjmut a přemístěn do snímacího systému MiniBis. Ten je opatřen UV transiluminátorem a kamerou. Zde se zhotoví fotografie gelu, která se zobrazí na monitoru PC, který je připojen k systému MiniBis. Vysokoškolský pracovník provede vyhodnocení a uloží výsledky s datem a stručným popisem fotografie gelu.

Pro stanovení CMV dochází k separaci fragmentů v agarózovém gelu o těchto velikostech:

PCR1 = 268 bp

PCR2 = 183 bp

Pro přesnější vyhodnocení dáváme do prázdné jamky do gelu vedle vzorků, pozitivní kontroly a negativní kontroly, ještě velikostní standard molekulové hmotnosti tzv. marker (ladder). V naší laboratoři je používán velikostní Ladder 50.



Obr. č. 2: Ladder 50 zdroj: <http://www.neb.uk.com/>

Na obrázku je znázorněn velikostní standard Ladder 50 na agarózovém gelu z elektroforézy. Po pravé straně sloupce jsou znázorněny číselné hodnoty velikosti udávané v bp (párů bází).

3.4.2. Real Time PCR na přístroji Rotor Gene

Kvalitativní stanovení DNA CMV lze provádět také pomocí Real-time PCR na přístroji Rotor Gene.

Metoda Real-time PCR (tzn. v reálném čase) je založená na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během reakce. Děje se tak pomocí fluorescenčních barviv nebo sond, které detekují množství produktu PCR již během reakce. Výhodou je, že množství produktu lze kvantifikovat. Protože ke kvantifikaci DNA CMV využíváme ještě jinou PCR metodu, proto tuto metodu zatím využíváme ke kvalitativnímu stanovení. (27)

K detekci CMV používáme systém Real Time PCR – TaqMan SNP Genotyping Assays firmy Applied Biosystems. Pomocí specifických primerů a specifických fluorescenčních sond dochází k amplifikaci specifického úseku DNA bezprostřední detekci amplikonu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor Gene. K termocykleru Rotor Gene Q je připojena počítačová jednotka se softwarem pro přístroj Rotor Gene Q.

3.4.2.1 Reagencie a skladování:

- Mix specifických primerů a sond – před prvním použitím se musí rozplnit do označených sterilních mikrozkušavek do 10 μ l, uložit do označené krabičky a skladovat v mrazicím boxu.
- Voda pro PCR – taktéž se skladuje v mrazicím boxu

3.4.2.2 Příprava amplifikační reakce

Amplifikační směs se připravuje v laboratoři pro Master Mix v PCR boxu. Pro jeden vzorek se připraví smícháním 19 μ l směsi, která obsahuje 8,75 μ l PCR H₂O, 10,0 μ l SuperShot Master Mixu a 0,25 μ l směsi specifických primerů a sond, s jedním μ l templátové DNA (nebo 1 μ l pozitivní kontroly, nebo 1 μ l vody pro negativní kontrolu). Celkový objem amplifikační směsi tak činí 20 μ l.

Směs se připravuje na chlazeném stojánku a je rozpipetována do sterilních PCR zkumavek o objemu 0,2ml s plochým víčkem. Zkumavky se označují pouze na víčku. Připravuje se i vzorek pro pozitivní kontrolu.

V izolační místnosti se pak do reakční směsi přidává 5µl vyizolované DNA.

Vlastní amplifikace a detekce probíhá v PCR místnosti na přístroji Rotor Gene Q pomocí následujícího schématu:

94°C	2 min	1x	
94°C	10 sec	}	30x
60°C	20 sec		
72°C	1 min		

3.4.2.3 Detekce a vyhodnocení

Přístroj Rotor Gene Q pomocí Rotor Gene Q software automaticky detekuje přítomnost amplifikované virové DNA.

3.5 Kvantitativní stanovení DNA CMV

V laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice, a.s., se kvantitativní stanovení DNA CMV provádí metodou Real Time PCR na přístroji LightCycler.

Pro detekci a kvantifikaci CMV DNA se zde používá komerční kit Artus CMV LC PCR pro real-time PCR na přístroji LightCycler.

CMV LC Master obsahuje reagentie a enzymy pro specifickou amplifikaci 105 bp dlouhého úseku genomu CMV a také pro bezprostřední detekci amplifikátu pomocí přístroje LightCycler1.2. Kromě toho souprava obsahuje i druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice založený na detekci interní kontroly (IC). Analytický limit detekce přitom není negativně ovlivněn. IC je přidávána do každého vzorku a pozitivní a negativní kontroly a společně s cílovou sekvencí prochází celým procesem PCR amplifikace a detekce.

Součástí kitu jsou i kvantifikované standarty (CMV LC QS 1 – 4) s jejichž pomocí lze určit množství viru ve vzorku. Analyzátor vypočítává titr virové DNA v testovaných vzorcích tak, že u každého vzorku porovnává signál se signálem kvantitativního standartu, který je přiřazen ke kalibrační křivce dané šarže.

Analytický limit detekce udaný výrobcem soupravy CMV LC – PCR kit v kombinaci přístroji Light Cycler 1.2 je 0,2 IU/μl (p = 0,05). To znamená, že bude s 95% pravděpodobností detekováno 0,2 IU/μl.

Specifita CMV LC PCR byla rovněž ověřována a validována výrobcem. Je zaručena výběrem primerů a sond a volbou přísných reakčních podmínek. Primery a sondy byly na základě sekvenční analýzy přezkoušeny na eventuální homologie se všemi sekvencemi publikovanými v genových bankách. Tímto způsobem byla kontrolována také detekovatelnost všech relevantních subtypů a genotypů.

Validace specifity byla výrobcem provedena na 100 různých CMV negativních vzorcích plazmy, které spolu s CMV specifickými primery a sondami obsaženými v CMV LC Master negenerovaly žádný signál. K určení specifity CMV LC PCR Kit byla kontrolní skupina testována výrobcem na křížovou reaktivitu. Žádný z testovaných původců nebyl reaktivní. Při smíšených infekcích se nevyskytly žádné křížové reaktivity.

Lineární oblast kvantifikace (analytické měření) soupravy LC CMV PCR Kit byla výrobcem testována a byla určena analýzou řady měření CMV in vitro transkriptu 1×10^{-2} IU/μl do 10^8 IU/μl. Řada ředění byla kalibrována pomocí „WHO International CMV DNA Standard“. Lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci soupravy CMV LC PCR Kit se tudíž vztahuje na koncentrace od 20 IU/ml do minimálně 14×10^9 IU/ml.

3.5.1.1 Reagencie a jejich skladování

Artus CMV LC PCR Kit se nenačatý skladuje v mrazicím boxu, po prvním použití se musí reagencie rozplnit a v alikvotech opět skladovat v mrazicím boxu.

Kit obsahuje:

- CMV LC Master
- CMV LC Mg Sol
- CMV LC IC

3.5.1.2 Příprava reakční směsi

Reakční směs se připravuje v laboratoři pro Master Mix v PCR boxu dle následující tabulky:

Tabulka č. 3: Příprava reakční směsi pro kvantitativní stanovení DNA CMV pro jeden vzorek (dle komerčního kitu – Artus CMV LC PCR Kit) na přístroji Light Cycler

		množství [μl]
1. Příprava Master Mixu	CMV LC Master	12,5
	CMV LC RG/TM Mg-Sol	2,5
	CMV LC/RG/TM IC	1
	celkový objem	16
2. Příprava PCR reakce	Master mix	15
	Izolát DNA	10
	celkový objem	25

Směs se připravuje na speciálním chlazeném stojánku s adaptéry a rozplňuje se do skleněných mikrokapilár po 15 μ l. V izolační místnosti v boxu se pak do mikrokapilár přidává 10 μ l vyizolované DNA. Kapiláry se uzavřou sterilní zátkou a v adaptéru se centrifugují cca 10s/1000 x g.

Vlastní amplifikace a detekce probíhá na přístroji Light Cycler v PCR laboratoři.

Reakční schéma:

Touch down

Tabulka č .4: Reakční schéma na přístroji Light Cycler

Parametry	Denat.	Cycling		
Analysis mode	None	None		
Cycles	1	10		
Target [°C]	95	95	65 » 55	72
Hold [mm:ss]	5	5	20	15
Ramp Rate [°C/ s]	20	20	20	10
Aquisition Mode	none	none	none	none

Amplifikace DNA

Tabulka č. 5: Reakční schéma amplifikace DNA na přístroji Light Cycler

Parametry	Cycling			Cooling
Analysis mode	Quantifikation			None
Cycles	40			1
Target [°C]	95	55	72	40
Hold [mm:ss]	5	20	15	30
Ramp Rate [°C/ s]	20	20	10	20
Aquisition Mode	none	none	none	none

3.5.1.3 Detekce a vyhodnocení

Přístroj Light Cycler pomocí příslušného softwaru automaticky detekuje přítomnost virové DNA pomocí prahové hodnoty cyklu (Ct) a následně provádí kvantifikaci DNA na základě srovnání kvantifikačního standardu a importované kalibrační křivky pro danou šarži soupravy. V kanále F1 se provádí odečet fluorescence po amplifikaci virové DNA a v kanále F3/ Back F1 se amplifikuje a detekuje interní kontrola.

Závěrečné hodnocení analýzy se opírá o následující tabulku:

Tabulka č. 6: Hodnocení výsledků na přístroji Light Cycler s pomocí interní kontroly.

Výsledné vyhodnocení	Signál v det. Kanálu F1	Signál v det. Kanálu (IC) F3 / Back F1
pozitivní	+	+
pozitivní	+	-
Negativní	-	+
Nelze hodnotit	-	-

Z přístrojem vyhodnocených dat se podle následujícího vzorce vypočítá reálná hodnota kopií CMV DNA.

$$\text{Výsledek (IU/ml)} = \frac{\text{Výsledek (IU/}\mu\text{l)} \times \text{eluční objem (}\mu\text{l)}}{\text{Objem vzorku (ml)}}$$

Interní kontrola prochází celým procesem reverzní transkripce a amplifikace, plní funkci kontroly celého procesu, tzn. IC zabraňuje falešně negativním výsledkům.

Pozitivní, ev. negativní kontroly umožňují kontrolovat řádný průběh amplifikační reakce (citlivost reakce).

Výsledek pozitivní kontroly a interních kontrol se uvádí do protokolu.

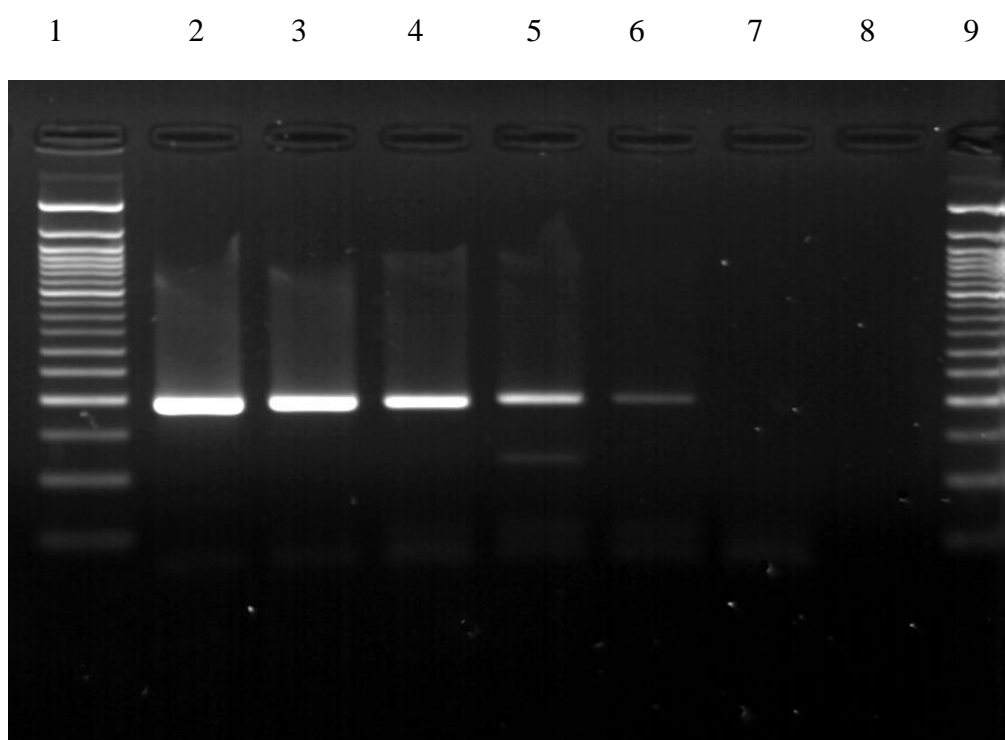
4. Výsledky

4.1 Zavedení metody Real-time PCR pro kvalitativní stanovení DNA CMV

Po osvojení metody nested PCR ke kvalitativnímu stanovení DNA CMV byla zavedena metoda real-time PCR na přístroji Rotor Gene.

Pro srovnání metody nested PCR a metody real-time na přístroji Rotor Gene jsem použila izolát DNA z referenčního kmene CMV AD 169. Byla použita koncentrovaná DNA, která byla dále 5x naředěna – 10x až 100 000x. Vyizolovaná naředěná DNA každé koncentrace byla použita jako templát pro oba způsoby PCR. Konečné výsledky PCR jsou uvedeny na obrázcích č. 3 (u metody nested PCR) a č. 4 (u metody real-time na přístroji Rotor Gene).

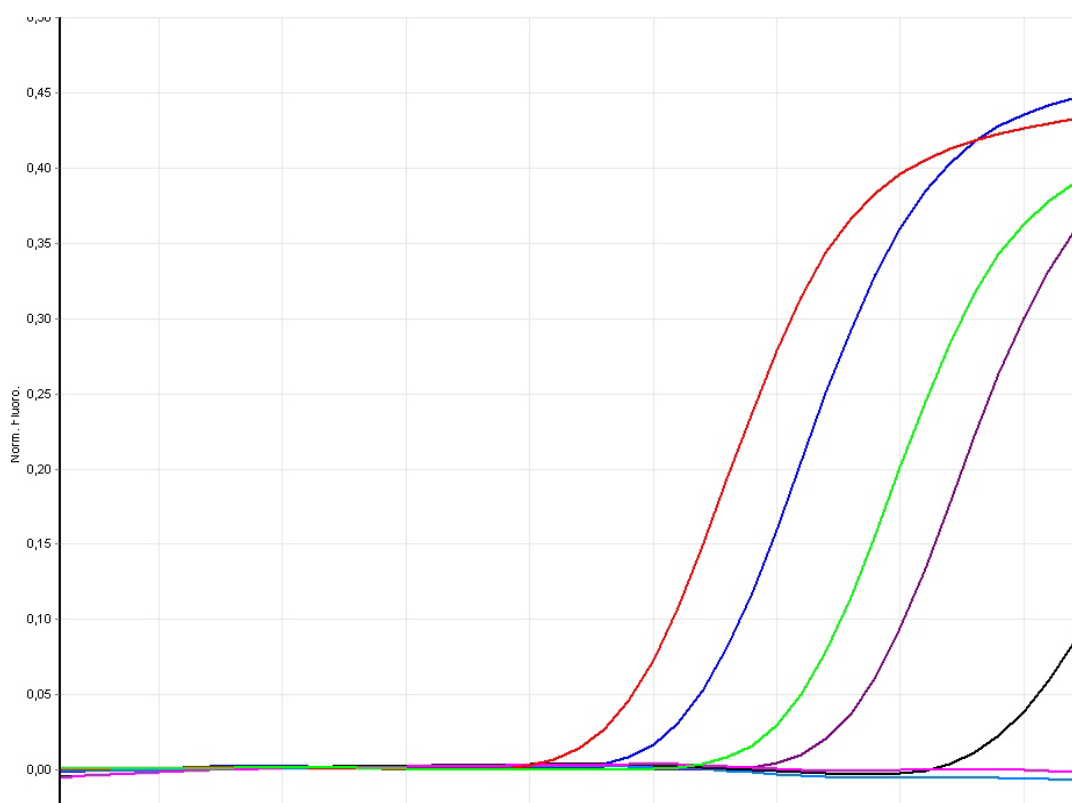
U metody nested PCR (dvojitá PCR) se za pomoci dvou párů specifických primerů amplifikují úseky virové DNA, které jsou následně detekovány na agarózovém gelu v elektroforéze.



Obr. č. 3: Výsledek kvalitativního stanovení DNA CMV u metody nested PCR pomocí elektroforézy na agarózovém gelu

Obrázek zobrazuje 9 jamek s produkty z 2. PCR nested reakce o velikosti 183 kb, negativní kontrolu bez přidané DNA, která se nachází v 8.jamce a dva velikostní standardy molekulové hmotnosti (Ladder 50), které jsou v 1. a 9.jamce.. V jamce 2 je koncentrovaný vzorek a v jamkách 3-7 je tentýž vzorek postupně ředěný 10x-100000x. Na obrázku agarózového gelu je vidět intenzita jednotlivých ředění produktu PCR. Čím silnější pruh, tím více koncentrovaná DNA. Poslední ředění již je za hranicí detekovatelnosti.

U zavedené metody ke kvalitativnímu stanovení DNA CMV real-time PCR na přístroji Rotor Gene se pomocí specifických primerů a specifických fluorescenčních sond amplifikuje specifický úsek DNA a bezprostředně se detekuje amplicon ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor Gene Q.



Obr. č. 4: Výsledek kvalitativního stanovení DNA CMV u metody real-time na přístroji Rotor Gene

červená křivka – neředěný vzorek

tmavě modrá křivka – 10x ředěný vzorek

zelená křivka – 100x ředěný vzorek

fialová křivka – 1000x ředěný vzorek

černá křivka – 10000x ředěný vzorek

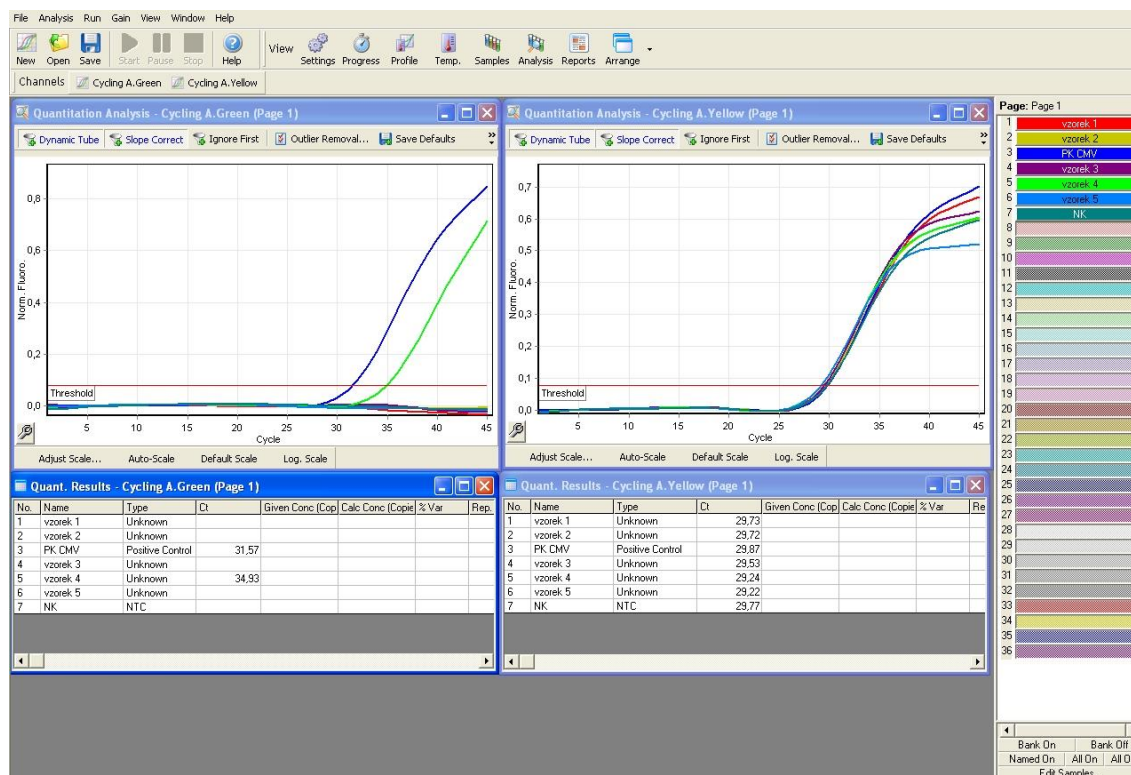
růžová křivka – 100000x ředěný vzorek

světle modrá křivka – negativní kontrola bez přidané DNA

na ose x – počet cyklů

Čím dříve se křivka zvedá, tím větší je koncentrace DNA.

Výhodou této metody je použití interní kontroly u každého vzorku, což umožňuje kontrolu inhibice. Vzorek, u kterého nedojde k amplifikaci interní kontroly, nelze hodnotit.



Obr. č. 5: Vyhodnocení výsledků na přístroji Rotor Gene s použitím interních kontrol

Na obrázku č. 5 je vyhodnoceno celkem 7 vzorků, pět z nich jsou klinické vzorky, jeden vzorek je pozitivní kontrola a jeden vzorek negativní kontrola. V levém rámečku jsou výsledky PCR produktů, v pravém rámečku výsledky interních kontrol. Modrá křivka v levém rámečku znázorňuje pozitivní kontrolu, světle zelená křivka je pozitivní vzorek č. 4. Ostatní křivky, které se nezvedají (jsou vodorovné) znamenají, že se jedná o negativní vzorky, včetně negativní kontroly, která je tmavě zelené barvy.

V pravém rámečku jsou znázorněny interní kontroly (IC). Křivky IC se zvedají ve stejném cyklu, tudíž PCR reakce proběhla v pořádku. Zcela vpravo je v rámečcích uveden počet vzorků, jejich popis a jejich barevné značení.

Z výsledků stejného ředění PCR produktu (vyizolovaného kmene CMV AD 169) u metody nested PCR a u metody real-time na přístroji Rotor Gene je patrná srovnatelná citlivost obou metod. Časově náročnější je metoda nested PCR, která trvá přibližně 6 až 7 hodin včetně izolace DNA. Doba trvání u metody real-time na přístroji Rotor Gene včetně izolace DNA je zhruba 2,5 hodiny.

Pro srovnání obou metod bylo použito 150 vzorků od 75 pacientů. Konkrétně 75 vzorků plné krve a 75 vzorků krevní plazmy. Obě metody běžely současně. Ze všech 150 vzorků se lišil pouze jeden, který byl pozitivní u metody nested PCR, ale v real-time PCR na přístroji Rotor Gene byl negativní. Můžeme říci, že se jednalo o prahovou hodnotu DNA CMV u tohoto vzorku.

4.2 Kvantitativní hodnocení

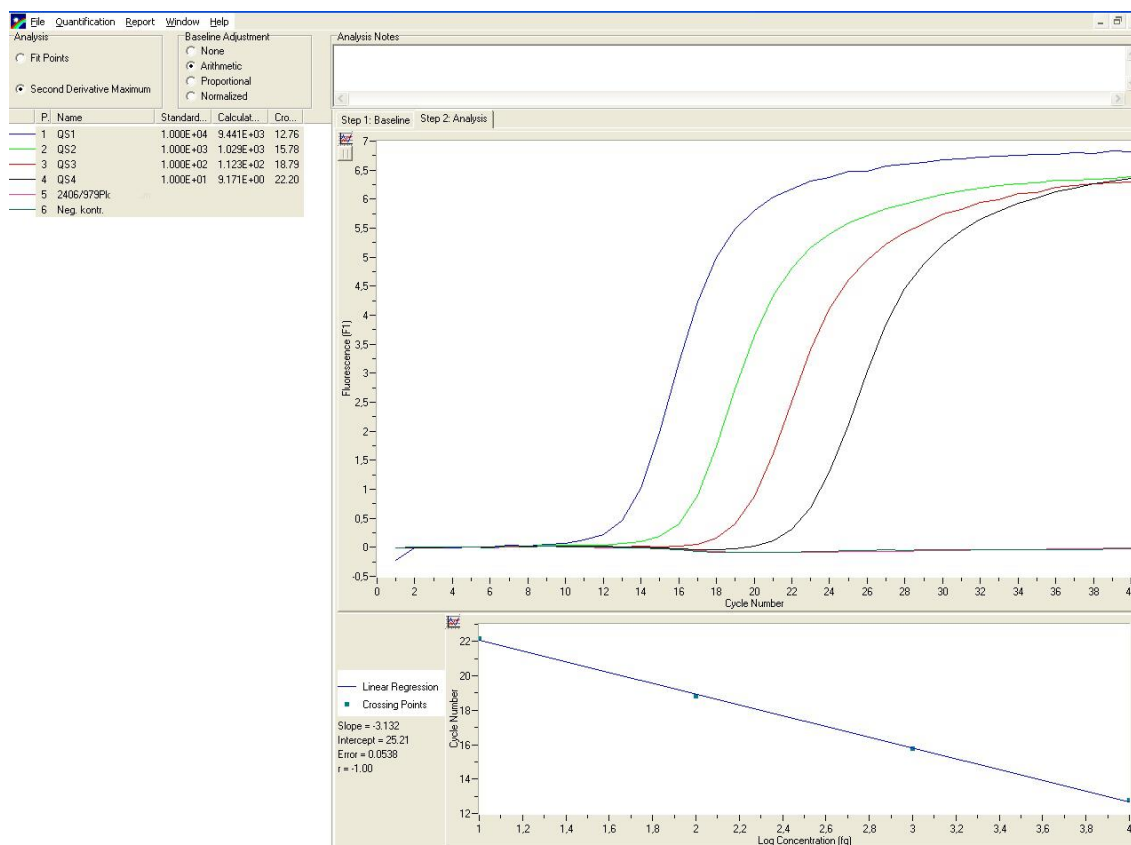
Kvantitativní stanovení byla provedena metodou real-time na přístroji Light Cycler.

Kvantitativní hodnocení se uvádí v množství kopií/ml vzorku. Jedná se o variantu PCR, která umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce. Light Cycler umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky fluorescence během každého cyklu. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. **(19,28)**

Kvantita pozitivních vzorků se počítá podle standardní kalibrační křivky (obr. 6), která je složená ze standard o známé kvantitě dané výrobcem. Přístroj Light Cycler vyhodnotí standardy a sestrojí lineární kalibrační křivku, dle které jsou vyhodnoceny vzorky o neznámé koncentraci.

Standardy:

- QS1 = 1×10^4 UI/ml
- QS2 = 1×10^3 UI/ml
- QS3 = 1×10^2 UI/ml
- QS4 = 1×10^1 UI/ml



Obr. č. 6: Kalibrační křivka na přístroji Light Cycler

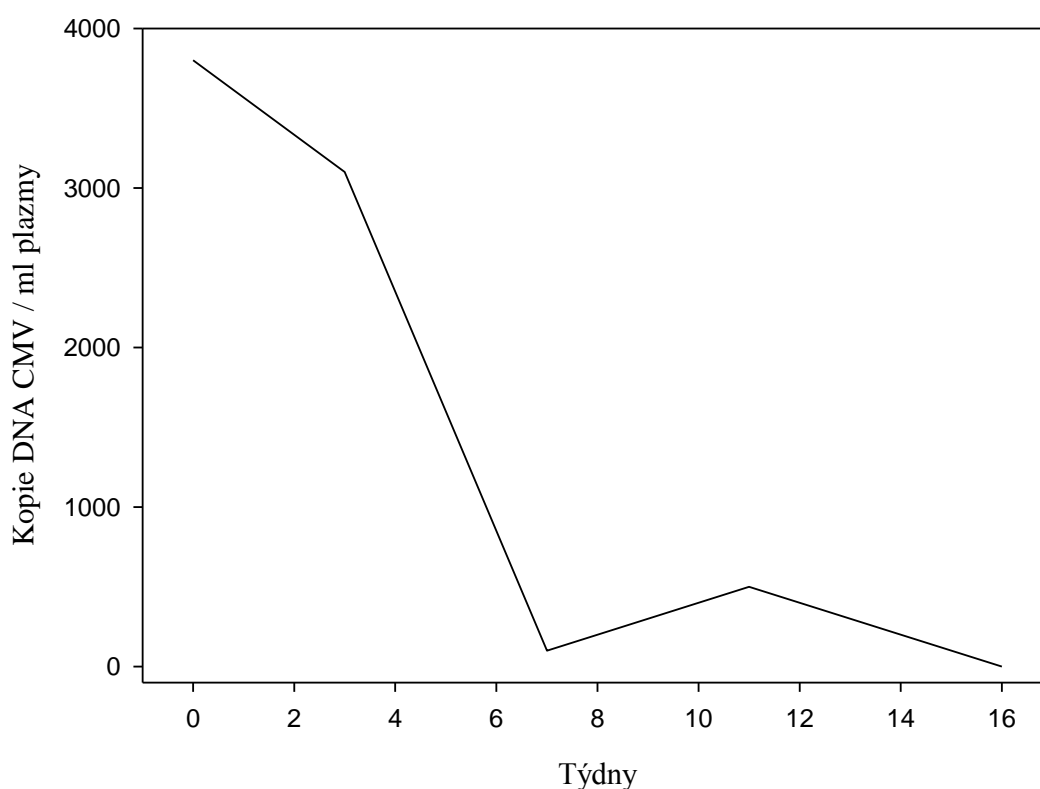
Na obrázku č. 6 v levém horním poli je tabulka, kde jsou vypsány a barevně označeny použité standardy QS1, QS2, QS3, QS4 a negativní kontrola a jejich naměřené hodnoty. V pravém horním rámečku jsou vyobrazeny křivky standard a negativní kontroly. Z obrázku je patrné, že nejsilnější standard je modrá křivka QS1, nejslabší standard pak tmavě modrá křivka QS4. Křivka s negativní kontrolou je vodorovná.

Ve spodním rámečku je pak vyobrazená kalibrační křivka z použitých standard.

4.2.1 Využití kvantitativního stanovení DNA CMV

Metoda PCR kvantitativního stanovení se používá hlavně při monitoringu léčby virostatiky (viz. Graf č. 1).

Graf č. 1: Kvantitativní stanovení DNA CMV v průběhu léčby CMV infekce u novorozence



Týden	0	3	7	11	16
Počet kopií CMV/ml plazmy	3800	3100	100	500	0

U novorozence činila hodnota DNA CMV po narození v plazmě 3800 kopií/ml plazmy. Z grafu a tabulky je vidět pokles hladiny DNA CMV v 7. týdnu od stanovení akutní infekce CMV. V 11. týdnu došlo k nepatrnému nárůstu hladiny DNA CMV v krevní plazmě a ve vzorku odebraném v 16. týdnu už nejsou známky CMV infekce, poslední vzorek krevní plazmy je již negativní.

4.3 Srovnání výtěžnosti DNA CMV u dvou způsobů izolací

Pro srovnání výtěžnosti dvou způsobů izolací bylo použito 10 pozitivních vzorků CMV a vyizolováno dvěma způsoby izolací. Jednak ruční izolací za použití QIAmp[®] DNA Mini Kitu od firmy QIAGEN a izolací na izolátoru MagCore za použití MagCore Genomic DNA Whole Blood Kitu.

Tabulka č. 7: Porovnání výtěžnosti produktů PCR u 10 pozitivních vzorků CMV izolovaných ruční izolací a automatizovanou izolací pomocí izolátoru MagCore

Hodnoty kvantifikace DNA CMV u ruční izolace (IU / ml)	Hodnoty kvantifikace u izolace na izolátoru MagCore (IU / ml)
$8,7 \times 10^2$	$8,4 \times 10^2$
$3,6 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
$1,3 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$
$1,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
$6,3 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$
$9,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$
$3,9 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
$4,8 \times 10^2$	$6,3 \times 10^2$
$2,1 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
$2,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$

Byla provedena statistická analýza pomocí párového T- testu. Dosažená hodnota hladiny významnosti α činila 0,49. Nemůžeme tak popřít nulovou hypotézu o shodnosti naměřených hodnot. Nebyl tedy zjištěn signifikantní rozdíl mezi izolacemi. (17)

Pomocí párového t-testu bylo zpracováno a kvantitativně vyhodnoceno 10 vzorků izolovaných oběma způsoby izolací. Na základě výsledků v tabulce lze konstatovat, že obě izolace jsou srovnatelné. Pro izolaci DNA lze tedy použít oba způsoby izolací. Byla dosažena hladina významnosti, nelze zamítnout nulovou hypotézu.

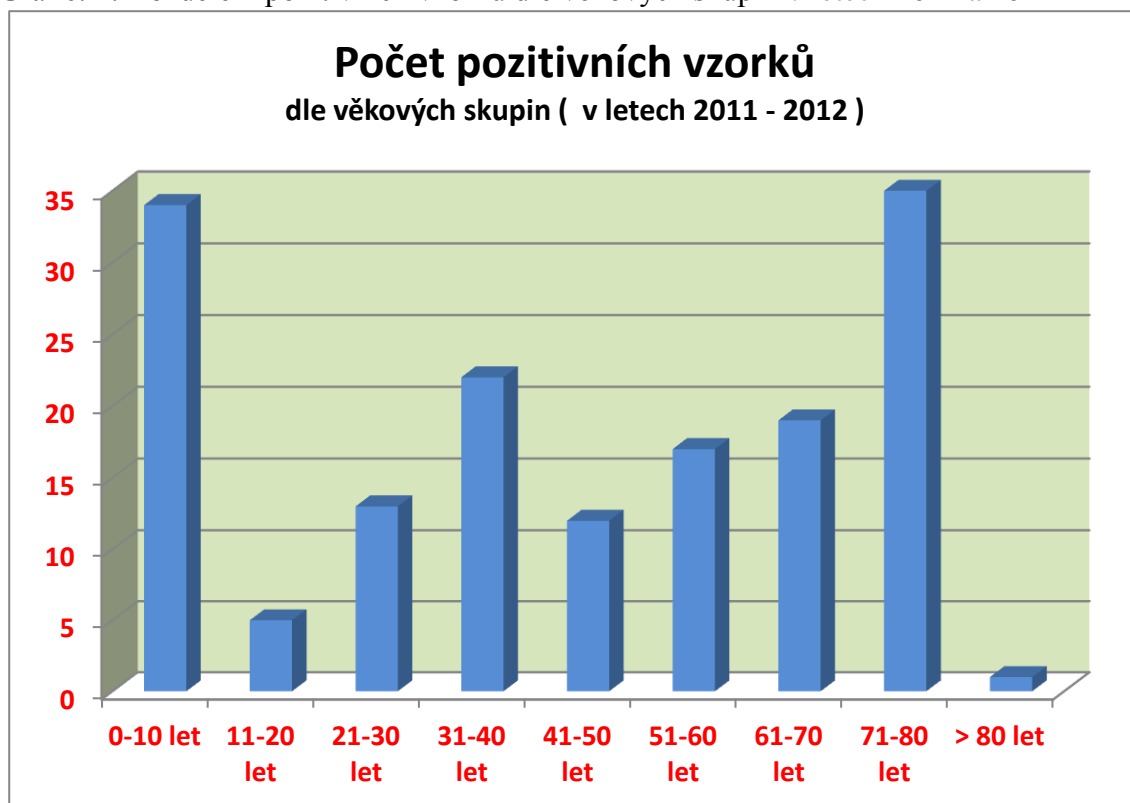
4.4 Vyhodnocení vzorků DNA CMV v letech 2011 a 2012

V laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice, a.s., bylo v letech 2011 a 2012 zpracováno celkem 1867 klinických vzorků ke stanovení DNA CMV. Z těchto vyizolovaných vzorků bylo 158 vzorků pozitivních. (viz. tabulka č. 8)

Tabulka č. 8: Počet izolovaných vzorků ke stanovení CMV v laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice, a.s., v letech 2011 a 2012

Počet vzorků	Rok 2011	Rok 2012
Celkem	886	981
Pozitivní	87	71
Negativní	799	910
% Pozitivní	9,82	7,24

Graf č. 2: Rozdělení pozitivních vzorků dle věkových skupin v letech 2011 a 2012



V grafu č. 2 je znázorněno množství pozitivních vzorků v letech 2011 a 2012 rozdělených do věkových skupin pacientů s pozitivními výsledky, kdy jedna věková skupina činí rozmezí 10 let. Z grafu vyplívá, že nejvíce pozitivních vzorků DNA CMV bylo u nejstarších pacientů (od 71 do 80 let věku pacienta) a u nejmladších pacientů (do 10 let věku pacienta). Nejčastějšími diagnózami u těchto pacientů byla mononukleóza, zánět jater, horečka, transplantace a onkohematologické diagnózy.

5. Diskuze

Cytomegalovirové infekce mohou být velmi závažné, proto je důležitá jejich včasná diagnostika. Obzvláště nebezpečné mohou být u imunokompromitovaných pacientů jako jsou lidé po transplantacích, lidé HIV pozitivní, ale také těhotné ženy a novorozenci. Je třeba zvážit, kdy je postačující vyšetření protilátek a kdy je nezbytný přímý průkaz CMV. Právě u velmi oslabených jedinců je pak nutné sledovat hladiny cytomegalové infekce. K tomu se jeví jako nejvhodnější molekulárně biologické metody, konkrétně metody PCR. I zde záleží na jejich správné volbě. **(26)**

Pro kvalitativní hodnocení jsem srovnávala dvě PCR metody – metodu nested PCR a metodu real-time na přístroji Rotor Gene. Výhody nested PCR jsou vysoká citlivost, nízká finanční nákladovost. Nevýhodami jsou pak časová náročnost, celková pracnost, vyšší riziko kontaminace, práce s karcinogenním ethidiem bromidem. **(30)**

Testovalo se 150 vzorků, z nichž pouze jeden neprokazoval pozitivitu u metody real-time. U 149 vzorků byly shodné výsledky u obou metod. Lze to vysvětlit tím, že u prahových koncentrací nedojde k exponenciálnímu průběhu reakce. Na základě těchto výsledků byla zavedena pro běžné kvalitativní stanovení CMV metoda real-time. Metoda real-time na přístroji Rotor Gene se jeví se jako výhodnější, zejména co se týká rychlosti, kvality a menšího rizika kontaminace. Výhodou je zde i používání interních kontrol jako kontrol pro případné inhibice.

Pro kvantitativní stanovení CMV se osvědčila metoda real-time na přístroji Light Cycler. Pomocí výrobcem soupravy daných standardů lze určit hladinu CMV (jeho množství). Kvantifikace je nesmírně důležitá u imunokompromitovaných pacientů. Protože léčba cytomegalovirových infekcí je toxická, proto je dobré tuto léčbu co nejdříve ukončit. K tomu slouží monitoring hladiny virémie u nemocných pacientů prováděný v určitém časovém rozmezí. **(3,30)**

Dále jsem měla možnost porovnat dva způsoby izolací DNA CMV, jednak manuální izolaci kolonkovou metodou a izolaci pomocí přístroje (izolátoru) tzv. magnetickou metodou. Pro obě izolace jsem použila komerčně vyráběné izolační kity. Pro manuální izolaci byl použit QIA[®] DNA Mini Kit od firmy QIAGEN a pro automatizovanou izolaci na izolátoru MagCore byl použit izolační kit MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit. Při jejich srovnávání jsem se zaměřila na kvalitu izolačních souprav, délku trvání obou izolací (tedy časovou náročnost) a kdy byla nižší hrozba kontaminace. Ke srovnání izolací jsem jako klinický materiál používala nesrážlivou krev s přídavkem EDTA a krevní plazmu. Při izolaci méně vzorků jsou obě izolace časově srovnatelné. Při izolaci více vzorků se jeví jako časově výhodnější izolace pomocí izolátoru, protože přístroj je schopen izolovat 16 vzorků současně. U izolace DNA na izolátoru je nižší riziko kontaminace. Kvalita izolátů DNA je srovnatelná. Izoláty DNA z obou izolací lze použít jak ke kvalitativnímu stanovení CMV, tak ke kvantitativnímu stanovení. (20)

V laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice, a.s., bylo v roce 2011 zpracováno 886 klinických vzorků k průkazu CMV. Jednalo se o krve, krevní plazmy, mozkomíšni moky, moče, sputa, tkáně, mateřská mléka a stěry. Pozitivní nález byl u 87 vzorků, nejčastěji u vzorků krve, byl zaznamenán i jeden pozitivní nález u mozkomíšního moku.

V roce 2012 bylo zpracováno celkem 981 klinických vzorků k průkazu CMV. V tomto roce jich bylo pozitivních 71, opět nejvíce stanovených v krvi.

Ze všech pozitivních vzorků stanovených v letech 2011 a 2012 bylo nejvíce pozitivních vzorků CMV u starších pacientů (věková kategorie 71-80 let) a taktéž u nejmladších pacientů (věková kategorie do 10 let věku pacienta).

6. Závěr

Cytomegalovirus může způsobovat vážná onemocnění, proto je důležitý přímý průkaz viru. K tomu byly použity molekulárně biologické metody.

Kvalitativně byl tento virus dlouho stanovován metodou nested PCR. Jedná se o velmi citlivou metodu, ale časově náročnou. Proto byla jako rutinní metoda zavedena metoda real-time PCR na přístroji Rotor Gene. Jde o rychlou metodu. Zde probíhá pouze jednokroková PCR, odpadá další manipulace se vzorky. Citlivostně je tato metoda srovnatelná s metodou nested PCR. Pro své výhody, jako je rychlost, srovnatelná citlivost, nižší riziko kontaminace, metoda real-time předčila metodu nested PCR a je více využívána ke kvalitativnímu stanovení CMV DNA.

Kvantitativní stanovení DNA CMV bylo prováděno metodou real-time na přístroji Light Cycler. Tato metoda se jeví jako spolehlivá pro stanovení hladiny CMV. Tato metoda našla uplatnění i u statimových vyšetření. Časově se dá tato metoda zvládnout do dvou hodin včetně izolace. Je ovšem finančně nákladnější. Tato metoda umožňuje sledovat množství CMV (hladinu virémie) v průběhu léčby imuno-kompromitovaných pacientů.

V této práci jsem se zaměřila také na srovnání dvou izolací DNA. Jednalo se o manuální izolaci DNA za použití izolačního kitu QIAmp[®] DNA Mini Kit, a izolaci DNA na automatizovaném přístroji MagCore pomocí izolačního kitu MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit. Rozdíly v naměřených hladinách získaných oběma izolacemi byly zanedbatelné, téměř nulové. Při porovnání výtěžnosti DNA CMV u 10 pozitivních vzorků CMV vyizolovaných oběma způsoby izolací byla provedena statistická analýza pomocí párového T-testu. Dosažená hladina významnosti α činila 0,49. Nelze tak popřít nulovou hypotézu o shodnosti obou izolací. Oba způsoby izolací jsou rovnocenné pro kvalitativní stanovení i kvantitativní hodnocení.

Za roky 2011 a 2012 bylo v laboratoři molekulární biologie a genetiky v Nemocnici České Budějovice, a.s., zpracováno celkem 1867 vzorků k průkazu CMV. Jednalo se o krve, krevní plazmy, mozkomíšní moky, sputa, tkáně, mateřská mléka a stěry. Pozitivní nález byl u 158 vzorků, což je přibližně 8,5% z celkového počtu vyšetřovaných vzorků. Nejvíce pozitivních výsledků bylo ze vzorků krve. V roce 2011 byl zaznamenán 1 pozitivní nález u mozkomíšního moku. Nejvíce pozitivních vzorků bylo u věkové kategorie 71 – 80 let a u nejmladší věkové kategorie dětí do 10 let.

7. Seznam použité literatury

1. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J: *Lékařská mikrobiologie (bakteriologie, virologie, parazitologie)*, s. 409-411, nakl. Marvil-Praha, 1996
2. Bednář M, Souček A, Vávra J: *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*, nakl. Triton-Praha, 1994. ISBN 80-901 521-4-7.
3. Cariani E, Pollara CP, Valloncini B, Perandin F, Bonfanti C, Manca N: Relationship between pp 65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients, *BMC Infectious Diseases*, 7, 2007.
4. Ducroux A, Cherid S, Benach A, Ville Y, Leruez-Ville M: Evaluation of new commercial Real-time PCR quantification assay for prenatal diagnosis of cytomegalovirus congenital infection, *J. Clin. Microbiol.*, 2008, p. 2078-2080.
5. Goegebuer T, Van Meensel B, Beuselinck K, Cossey V, Van Ranst M, Hanssens M, Lgrou K: Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples, *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 660-665, 2009.
6. Grys T E, Duquette D L, White B, Irish C, Hata D J, Pritt B S: Precision across the analytical measuring range of a quantitative real-time PCR assay for cytomegalovirus detection among three clinical laboratories, *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 3044-3046, 2011.
7. Gunson R N, Maclean A R, Shepherd S J, Carman W F: Simultaneous detection and quantitation of cytomegalovirus, Epstein-Baar virus, and adenovirus by use of real-time PCR and pooled standards, *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 765-770, 2009.
8. Havlík J: *Infekční nemoci*, 2. rozšířené vydání, Galén, 2002, s. 65, 97. ISBN 80-7262-173-4.
9. Hořejší V, Bartůňková J: *Základy imunologie*, 4. vydání, TRITON-Praha/Kroměříž, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.

10. Húska D, Baloun J, Trnková L, Adam V, Kizek R: Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA, CHEMagazín, roč XVIII, č.3, 14-15, 2008.
11. Ikuta K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Asano K, Koyano S, Inove N, Suzatani T: A novel real-time PCR method for determination and quantification of each cytomegalovirus glykoprotein H subtype in clinical sampels, Journal of Clinical Microbiology, 50: 499-501, 2012.
12. Janochová J: Izolace DNA : Výtěžnost a kvalita, Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno, 2009.
13. Kočárek E: Molekulární biologie v medicíně, NCO NZO, 1. vydání, Brno, 2007.
14. Korf R B, Prichard J D: Základy lékařské genetiky, 1. České vyd., Galén-Praha, 2007, s. 149-151. ISBN 978-80-7262-449-2.
15. Kozlová L, Kubelová V: Jak psát bakalářskou a diplomovou práci, 2.vydání, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2009, 55s. ISBN 978-80-7394-155-0.
16. Kramář R: Lékařská mikrobiologie, 1. vydání, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2007, 73s. ISBN 978-80-7394-021-8.
17. Lepš J : Biostatika, JČU, 1996.
18. Lervez-Ville M, Ducroux A, Rouzioux Ch: Exon 4 of the human cytomegalovirus(CMV) major immediate-early gene as a target for CMV real-time PCR, Journal of Clinical Microbiology, 46: 1571-1572, 2008.
19. Mackay I M: Real-time PCR in the mikrobiology laboratoř, Clin. Microbiol. Infect.,10(3): 190-212, 2004.
20. Mayer J, Dvořáková D, Krahulová M, Vorlíček J, Adler J: Diagnostika cytomegalové infekce pomocí polymerázové řetězové reakce a antigenémie u nemocných po alogenní transplantaci periferních kmenových buněk – srovnání 318 párových vzorků, Časopis lékařů českých, 138; 14: 436-440, 1999.

21. Michelin B D A, Hadžisejdić I, Božić M, Grahovac M, Hees M, Grahovac B, Marth E, Keesler H H: Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in EDTA whole-blood samples: evaluation of the quantitative Artus CMV Light Cycler PCR kit in conjunction with automated sample preparation, *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1241-1245, 2008.
22. Pillet S, Bourlet T, Pozzeto B: Comparative evaluation of QiaSymphony RQG system with the easyMAG/R-gene combination for the quantitation of cytomegalovirus DNA load in whole blood, *Virology Journal*, 9: 231, 2012.
23. Průša R: *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*, 1. vydání, Lambda Bio-Med, Praha, 1997, 45s. ISBN 80-238-0940-7.
24. Rong H, Zanping M, Ying W, Mali L, Yaohua J, Zhengrong S, Shujuan J, Qiang R: Characterization of the transcripts of human cytomegalovirus UL 144, *Virology Journal*, 14: 8-299, 2011.
25. Rosypal S: *Úvod do molekulární biologie*, druhý díl, 1. vydání, s. 321-324, Brno, 1996.
26. Ryšková O: *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie – učební texty pro bakalářské studium*, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha, 2007, s. 81-85. ISBN 978-80-346-0135-9.
27. Schäfer P, Braun R W, Möhring K, Henco K, Kang J, Wendland T, Kühn J E: Quantitative determination of human cytomegalovirus target sequences in peripheral blood leukocytes by nested polymerase chain reaction and temperature gel electrophoresis, *Journal of General Virology*, 74, 2699-2707, 1993.
28. Šmarda J: *Metody molekulární biologie*, 1. vydání, Masarykova univerzita Brno, 2005, 188s. ISBN 80-210-3841-1.
29. Valoup-Fellous Ch, Ducroux A, Couloigner V, Marlin S, Grangeot-Kros L, Leruez-Ville M: Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: Retrospective study of CMV congenital infection, *J. Clin. Microbiol.*, 2007, p. 3804-3806.

30. Vincent E, Gu Z, Morgerstern M, Gibson C, Pan J, Hayden R T: Detection of cytomegalovirus in whole blood using three different real-time PCR chemistries, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11: 54-59, 2008.
31. Votava M: Lékařská mikrobiologie obecná, 2.přepřac. vydání, Neptun, Brno, 2005, 351s. ISBN 80-86850-00-5.
32. Votava M: Lékařská mikrobiologie speciální, 1. Vydání, Neptun, Brno, 2003, 495s. ISBN 80-902896-6-5.
33. Žemla J, Čiampor F, Labuda M: Špeciálna virológia , SAP – Slovak Akademic Press, Bratislava, 1998, s. 38-46. ISBN 80- 88980-04-3.

8. Klíčová slova

CMV

Cytomegalovirová infekce

PCR

Real-time PCR

Kvalitativní stanovení

Kvantitativní stanovení

9. Seznam zkratk

AE pufr	-	eluční pufr
AL	-	lyzovací roztok
AW1	-	promývací roztok
AW2	-	promývací roztok
EDTA	-	ethylenediaminetetraacetic acid
ELFO	-	elektroforéza
FRET	-	fluorescence resonance energy transfer
RT-PCR	-	real-time PCR
TBE	-	trisborátový pufr
QS	-	kvantitativní standard