

Sylwia Rynans¹, Szymon Walter de Walthoffen¹, Tomasz Dzieciatkowski^{1*},
Grażyna Młynarczyk¹¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w czerwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Sposoby detekcji wykorzystywane w real-time PCR. 3. Zalety i wady techniki real-time PCR. 4. Zastosowanie real-time PCR w diagnostyce wirusologicznej. 5. Wykorzystanie real-time PCR w wirusologicznych badaniach naukowych. 6. Podsumowanie

Application of real-time PCR in virology

Abstract: Real-time PCR is based on the revolutionary technique of polymerase chain reaction, which allows amplifying DNA more than a billion-fold. This method is used to monitor the progress of a PCR reaction in real time, and permits the detection of the number of amplicons generated during each amplification cycle. The described technique is now easy to perform, has high sensitivity and specificity, and provides the scope for automation. Within the field of microbiology, the application of real-time PCR has a significant impact upon virology. This review presents the background, advantages and limitations, as well as common applications of real-time PCR in virology, including biomedical research and laboratory diagnostics.

1. Introduction. 2. Detection formats in real-time PCR technique. 3. Advantages and limitation of the method. 4. Real-time PCR in molecular diagnostics of viral diseases. 5. Use of real-time PCR in biomedical research. 6. Summary

Słowa kluczowe: real-time PCR, wirusologiczna diagnostyka molekularna, badania naukowe**Key words:** real-time PCR, molecular diagnostics in virology, biomedical research**1. Wstęp**

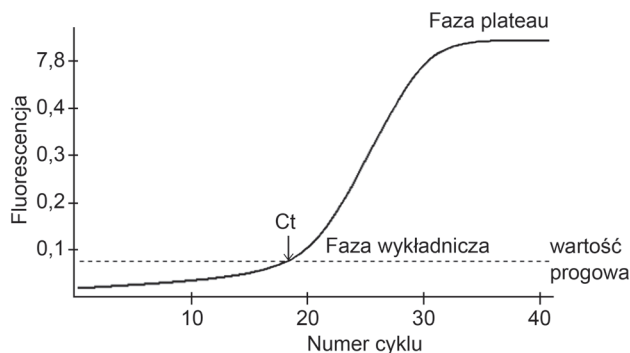
Łańcuchowa reakcja polimerazy (polymerase chain reaction; PCR) pozwala na amplifikację oraz detekcję określonego fragmentu kwasu nukleinowego, co znalazło zastosowanie w wielu dziedzinach nauki. Technika ta została opracowana w latach 80. XX wieku przez Karyego Mullisa [29], który w 1993 r. otrzymał za jej odkrycie Nagrodę Nobla. W roku 1992 Higuchi i wsp. stworzyli system pozwalający na wykrywanie produktów w czasie ich akumulacji, gdzie do mieszaniny reakcyjnej dodano bromek etydyny, który interkalował między powielone fragmenty dwuniciowego DNA. Próbkę naświetlane były promieniowaniem UV, a poziom otrzymanej fluorescencji wykrywano po każdym cyklu reakcji za pomocą kamery CCD połączonej z komputerem [15]. W ten sposób po raz pierwszy przeprowadzono PCR z analizą w czasie rzeczywistym (real-time PCR; qPCR). Real-time PCR pozwala na szybkie wykrywanie oraz powielanie kwasów nukleinowych, a także obserwację przebiegu reakcji w czasie jej trwania. Technika ta w oparciu o dane krzywej wzorcowej fluorescencji, pozwala także na oznaczenie liczby kopii wirusa w mieszaninie na początku

reakcji (ilościowy real-time PCR) [47]. Możliwość przeprowadzenia oznaczeń ilościowych znalazła szerokie zastosowanie w naukach przyrodniczych, w tym także w wirusologii. Dzięki temu qPCR jest cennym narzędziem diagnostycznym dającym możliwość przewidywania stanu zakażenia, identyfikację różnych etapów wirusowego zakażenia czy monitorowanie skuteczności zastosowanej terapii przeciwwirusowej [24, 27, 37, 46].

2. Sposoby detekcji wykorzystywane w real-time PCR

Analiza przyrostu produktu w czasie rzeczywistym możliwa jest dzięki zastosowaniu odpowiednich barwników lub sond fluorescencyjnych. Aparat, w którym przeprowadzana jest reakcja mierzy zmiany we fluorescencji badanej próbki podczas każdego cyklu amplifikacji. Emisja sygnału fluorescencji jest proporcjonalna do ilości produktu powstałego w każdym cyklu reakcji, a tym samym do ilości matrycy. Na początkową ilość DNA wskazuje pierwszy znaczący wzrost emisji fluorescencji przekraczający zdefiniowany próg (threshold cycle; C_t). Im większa wyjściowa liczba kopii amplifikowanego DNA, tym niższa wartość progowa cyklu [45, 47].

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel: 22 599 17 74; e-mail: dzieciatkowski@wp.pl



Ryc. 1. Wzrost fluorescencji próbki podczas amplifikacji w czasie rzeczywistym (obserwacje własne)

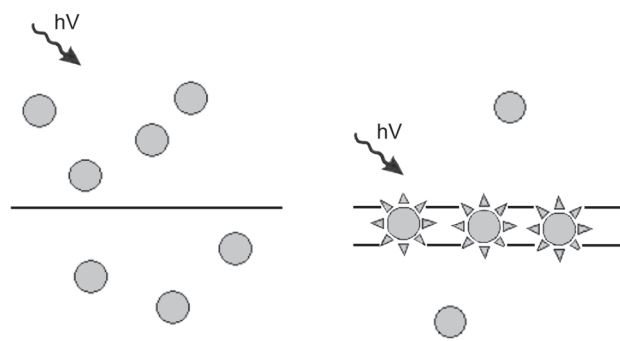
W powszechnym użyciu są zarówno swoiste sondy oraz nieswoiste barwniki fluorescencyjne. Do tych ostatnich należą związki, które po wnikięciu między dwuniciowe fragmenty DNA emitują fluorescencję. Początkowo stosowany barwnik nieswoisty – bromek etydyny – został zastąpiony przez bezpieczniejszą w użyciu pierwszą generację barwników takich, jak: jodek propidyny, SYBR Green I[®] czy też BEBO, z których najczęściej wykorzystywany jest wciąż SYBR Green I[®]. Barwnikami nieswoistymi drugiej generacji są fluorochromy umożliwiające analizę krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (high resolution melting; HRM), do których należą związki znane pod handlowymi nazwami EvaGreen[®], ResoLight, LC Green[®] czy SYTO 9. W przeciwieństwie do wcześniejszych barwników niespecyficznych, związki te wysycają niemal w 100% dsDNA bez wpływu na efektywność amplifikacji, a co za tym idzie umożliwiają wykrycie nawet pojedynczo nukleotydowych mutacji w obrębie amplifikowanej sekwencji [41, 47].

Test real-time PCR z użyciem barwników nieswoistych jest tani i łatwy do modyfikacji z konwencjonalnej techniki PCR, zaś wynik reakcji nie jest uzależniony od sekwencji kwasu nukleinowego, natomiast w zależności od długości amplifikowanego produktu otrzymuje się mniej lub bardziej intensywny sygnał fluorescencji [46]. Wadą opisywanych związków, zwłaszcza pierwszej generacji, jest jednak możliwość wnikania między produkty niespecyficzne lub dimery starterów, w wyniku czego możliwe jest uzyskanie wyników fałszywie dodatnich, zwłaszcza przy małych ilościach matrycowego DNA [2, 10]. Po zakończeniu reakcji z użyciem barwników nieswoistych należy przeprowadzić analizę krzywej topnienia produktu reakcji. Podczas tej analizy próbki są podgrzewane przy jednoczesnym pomiarze fluorescencji. Gwałtowny spadek fluorescencji następuje przy denaturacji dwuniciowego DNA, a temperatura topnienia jest uwarunkowana długością kwasu nukleinowego oraz zawartością par zasad. Sekwencje niespecyficzne będą ulegały denaturacji w innej temperaturze niż docelowy produkt reakcji.

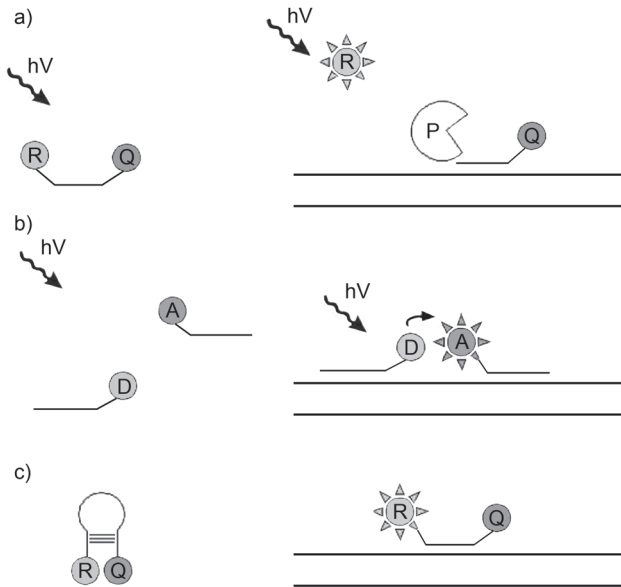
Zważywszy na niską specyficzność, ten wariant real-time PCR nie powinien być wykorzystywany w rutynowej diagnostyce chorób zakaźnych [10, 25].

Sondy swoiste są wyznakowanymi fluorescencyjnie oligonukleotydami komplementarnymi do amplifikowanych fragmentów DNA, wobec czego emisja fluorescencji możliwa jest wyłącznie w obecności swoistej matrycy [47]. Dostępne są różne rodzaje sond oligonukleotydowych, w zależności od użytego systemu ich znakowania. Najczęściej stosowane sondy hydrolizujące typu TaqMan[®] wyznakowane są na końcu 5' fluorochromem (reporterem; R), natomiast na końcu 3' wygaszaczem (quencher; Q). Bliska obecność wygaszacza w natywnej formie sondy pochałania energię fluorescencji barwnika reporterowego. Jeżeli w mieszaninie reakcyjnej znajduje się swoisty produkt PCR, następuje hybrydyzacja sondy do komplementarnej nici DNA. Podczas wydłużania produktu reakcji sonda ulega degradacji przez zmodyfikowaną polimerazę Taq o właściwościach 5'-egzonukleazy, w wyniku czego fluorochrom zostaje oddzielony od wygaszacza. Proces ten powoduje emisję fluorescencji, której natężenie mierzone jest po każdym cyklu reakcji [10, 26, 47].

Sondy hybrydujące (HybProbes[®]) stanowią układ dwóch oligonukleotydów komplementarnych do tej samej nici DNA. Sondy te hybrydują w bliskiej odległości od siebie, gdyż dzieli je około 10 nukleotydów [26, 47]. Pierwsza z sond znakowana jest na końcu 3' fluoresceiną (FITC), zaś druga na końcu 5' jednym z barwników z serii LightCycler Red. Sondy te są tak zaprojektowane, by podczas etapu wydłużania wiązały się z produktem PCR w niewielkiej odległości od siebie, dzięki czemu po wzbudzeniu FITC na końcu 3' pierwszej sondy energia fluorescencji jest przekazywana na fluorochrom końca 5' drugiej sondy. Zjawisko to, określane jako transfer energii fluorescencji (FRET), powoduje wzbudzenie barwnika LightCycler Red i emisję światła o innej długości fali, która następnie jest wykrywana przez detektor termocyklera. Sondy typu HybProbes[®] pozwalają na wyznaczenie krzywej topnienia amplifikowanego produktu i określenie jego



Ryc. 2. Schemat działania barwników nieswoistych [wg 26, 45 – zmienione]
hV – promieniowanie UV



Ryc. 3. Schemat działania swoistych sond fluorescencyjnych a) hydrolyzujących, b) hybrydujących, c) sond o kształcie szpilki do włosów [wg 25, 26, 45 – zmienione]

A – akceptor, D – donor, hV – światło, Q – wygaszacz, P – polimeraza, R – reporter

temperatury topnienia, jednak ze względu na kłopotliwy proces optymalizacji warunków reakcji oraz ograniczenia patentowe są stosunkowo rzadko wykorzystywane w testach komercyjnych [10, 26, 47].

Sondy o kształcie szpilki do włosów (Molecular Beacons[®]) posiadają odpowiednio wyznakowane reporterem i wygaszaczem komplementarne do siebie końce 3' i 5', a komplementarny do produktu PCR fragment środkowy tworzy jednoniciową pętlę. W obecności swoistej matrycy sonda ulega hybrydyzacji do fragmentu docelowego, co powoduje jej linearyzację oraz rozdzielenie cząsteczek reportera i wygaszacza w wyniku czego po wzbudzeniu obserwuje się emisję fluorescencji [26, 47].

Sondami specyficznymi są także rzadziej używany układ starterów/sond typu SCORPIONS[™], kwasy peptydonukleinowe (Peptide Nucleic Acid; PNA) czy też zmodyfikowane sondy typu TaqMan wiążące się z mniejszą bruzdą DNA (Minor Groove Binding; MGB) [46, 47].

3. Zalety i wady techniki real-time PCR

Choć istnieją inne metody biologii molekularnej umożliwiające przeprowadzenie oznaczeń ilościowych, większość z nich posiada pewne ograniczenia. Są one czasochłonne i pracochłonne, wykazują też niedostateczną czułość, wymagają użycia radioaktywnych izotopów lub są wrażliwe na kontaminację produktu. Przykładami takich technik są hybrydyzacja typu Northern czy też Southern, PCR-hybrydyzacja-ELISA (PCR-ELHA),

hybrydyzacja *in situ* oraz systemy wykorzystujące klasyczny PCR z rozdziałem DNA w żelu agarozowym [18, 45]. Metoda real-time PCR ma nad nimi przewagę z różnych powodów; przede wszystkim umożliwia przeprowadzenie analizy ilościowej kwasów nukleinowych w bardzo szerokim zakresie – minimum 7–8 jednostek logarytmicznych, co przedkłada się na wysoką czułość, pozwalającą na wykrycie nawet kilkunastu kopii badanej sekwencji. Dzięki temu możliwa jest też analiza próbek o niewielkiej objętości. Przeprowadzenie reakcji w systemie zamkniętym utrudnia kontaminację produktu, co minimalizuje ryzyko otrzymania wyników fałszywie pozytywnych. Szybkość oraz powtarzalność metody są jej kolejnymi zaletami. Wszystko to sprawia, że real-time PCR jest metodą coraz częściej wykorzystywaną zarówno w rutynowej diagnostyce, jak i badaniach naukowych. [22, 25]

Real-time PCR posiada jednak pewne ograniczenia: jej przebieg może być zakłócony obecnością inhibitorów w materiale klinicznym [40]. Przy ocenie ekspresji genów bardzo ważna jest jakość wykorzystanej matrycy. Nieprawidłowa izolacja wpływa na jakość RNA, co warunkuje wiarygodność uzyskanych wyników. Bardzo ważny jest też dobór odpowiedniego enzymu do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji, gdyż jakość otrzymanego cDNA będzie ważna dla prawidłowej oceny ekspresji [6]. Najważniejszym ograniczeniem są jednak błędy ludzkie przy projektowaniu metody. Wybór odpowiednich sekwencji sondy i starterów, dobór warunków reakcji oraz określenie jej specyficzności powinny być powtórzone wielokrotnie oraz zwalidowane. Nieprawidłowości na którymkolwiek etapie projektowania testu mogą powodować otrzymanie zafałszowanych wyników [45].

4. Zastosowanie real-time PCR w diagnostyce wirusologicznej

Przez wiele lat diagnostyka wirusologiczna była utrudniona ze względu na koszty, pracochłonność oraz brak umiejętności personelu w prowadzeniu hodowli

Tabela I

Zalety i ograniczenia techniki real-time PCR [wg 25, 26, 36, 45, 47]

Zalety	Ograniczenia
Szeroki zakres oznaczanych stężeń	Eksponencjalny przyrost ilości produktu
Wysoka czułość	Możliwość nakładania się widm emisji
Precyzyjność	Ryzyko zahamowania reakcji
Powtarzalność	przez inhibitory PCR
Minimalne ryzyko kontaminacji	Błędy przy zaprojektowaniu metody
Wysoka przepustowość	
Szybkość	

komórkowych, których wykorzystanie było „złotym standardem” w wykrywaniu zakażeń wirusowych. Hodowle komórkowe charakteryzowały się stosunkowo niską czułością; dodatkowo izolacja niektórych wirusów nie była, lub też wciąż nie jest, możliwa. Wykorzystywane do dzisiaj badania serologiczne, wykrywające wirusowe antygeny czy też swoiste przeciwciała w klasach IgM i IgG, są nieprzydatne we wczesnej fazie choroby oraz w detekcji zakażeń u osób z zaburzeniami odporności. Dlatego też wprowadzenie metod biologii molekularnej, w tym real-time PCR, przyczyniło się do znacznej poprawy diagnostyki wirusologicznej [36].

Technika real-time PCR jest często wykorzystywana do diagnostyki wirusowych zakażeń układu oddechowego, ośrodkowego układu nerwowego, zakażeń przenoszonych drogą krwi czy też zakażeń u osób poddanych immunosupresji [9]. Przy wielu zakażeniach wirusowych należy przeprowadzić oznaczenia ilościowe, które pozwalają na monitorowanie przebiegu zakażenia oraz skuteczności wdrożonej terapii przeciwwirusowej [14, 16, 19].

Badanie poziomu wirerii przy zakażeniu ludzkim wirusem niedoboru odporności (human immunodeficiency virus; HIV) jest ważnym elementem kontrolującym przebieg terapii. Wzrost wirerii w trakcie stosowania leków antyretrowirusowych może świadczyć o nabyciu oporności HIV na dany lek oraz progresji zakażenia, natomiast przy skutecznym działaniu leków wirerii jest zazwyczaj niewykrywalna [28]. Według rekomendacji Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS, po rozpoczęciu leczenia antyretrowirusowego, badanie HIV RNA powinno być wykonane po 2–8 tygodniach, po 3 miesiącach, a następnie raz na 3–6 miesięcy. Uzyskanie wirerii poniżej 400 kopii/ml po 3 miesiącach, oraz <50 kopii/ml po 6 miesiącach leczenia uznawane jest za osiągnięcie supresji wirusologicznej. Pojawienie się wykrywalnej wirerii HIV w trakcie trwania leczenia jest wskazaniem do przepro-

wadzenia badania lekooporności oraz zmiany terapii antyretrowirusowej [16].

Terapię wirusowego zapalenia wątroby typu B można rozpocząć m.in. jeżeli poziom DNA wirusa zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus; HBV) wynosi powyżej 2 000 IU/ml dla osób HBe(-) i powyżej 20 000 IU/mL dla osób HBe(+) [19]. W trakcie trwania terapii wymagane jest także monitorowanie jej skuteczności poprzez oznaczenia ilościowe HBV DNA. Jeżeli po 12 tygodniach od rozpoczęcia leczenia nie dojdzie do zmniejszenia wirerii o minimum 2 log₁₀ względem wartości wyjściowej należy przerwać podawanie leków. Jeżeli nastąpi spadek poziomu wirerii terapia jest kontynuowana, a oznaczenie HBV DNA należy przeprowadzić również w 24 i 48 tygodniu jej trwania. Obniżenie wartości HBV DNA poniżej 2 000 IU/ml bezpośrednio po zakończeniu terapii można uznać za dobrą prognozę, zważywszy na prawdopodobne odległe skutki leczenia interferonem. Ostatecznie skuteczność terapii uznaje się przy osiągnięciu wartości HBV DNA poniżej progu wykrywalności w surowicy (< 15 IU/ml) [19]. Technika multiplex real-time PCR wykorzystywana jest również do genotypowania HBV [36].

Przy wirusowym zapaleniu wątroby typu C (WZW C) oznaczenia ilościowe poziomu RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus, HCV) pozwalają na identyfikację pacjentów wymagających leczenia, monitorowanie jego przebiegu oraz dokumentację niepowodzeń terapii [3, 14]. Technika real-time PCR pozwala także na genotypowanie HCV, które należy wykonać obowiązkowo przed rozpoczęciem terapii [13]. Oznaczenie ilościowe należy wykonać koniecznie w 12 tygodniu terapii zakażeń genotypem 1, 4, 5 oraz 6. Brak wykrycia RNA HCV w 12 tygodniu leczenia daje 75% szansy na uzyskanie trwałej odpowiedzi immunologicznej, natomiast jeżeli nie stwierdza się spadku wirerii o minimum 2 log₁₀ względem wartości wyjściowej należy wówczas przerwać leczenie. W dal-

Tabela II
Zastosowanie real-time PCR w diagnostyce zakażeń wirusowych [wg 3, 9, 10, 22, 36, 37, 46]

Układ/narządy docelowe	Materiał kliniczny	Czynnik etiologiczny
Ośrodkowy układ nerwowy	Płyn mózgowo-rdzeniowy	CMV, EBV, enterowirusy, HHV-6, HHV-7, HSV, HTLV, wirus wścieklizny
Górne i dolne drogi oddechowe	Wymaz z nosa lub gardła, popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, aspirat tchawiczy	wirusy grypy, PIV, RSV, HAdV
Spojówki	Wymaz z rogówki lub worka spojówkowego	HSV, HAdV
Zmiany na narządach płciowych	Wymaz ze zmian bezpośrednich	HSV, HPV
Zmiany pęcherzykowe na skórze	Płyn z pęcherzyków	HSV, VZV
Zapalenie wątroby	Surowica krwi	HBV, HCV
Zakażenia u osób poddanych immunosupresji	Surowica krwi	BKV, CMV, HAdV, HIV, HTLV, HHV-6

szych tygodniach terapii możliwe jest przeprowadzenie oznaczeń ilościowych, jak i jakościowych [11, 14].

Oznaczanie poziomu wirerii jest także powszechnym standardem w monitorowaniu zakażeń wirusem cytomegalii (cytomegalovirus; CMV), zwłaszcza u pacjentów poddanych przeszczepieniu macierzystych komórek krwiotwórczych (haematopoietic stem cell transplantation; HSCT). CMV jest jedną z głównych przyczyn zachorowań oraz zgonów u osób poddanych immunosupresji, w tym biorców HSCT [24]. W monitorowaniu reaktywacji tego wirusa przez wiele lat jako „złoty standard” stosowano oznaczenie antygenu wczesnego CMV – fosfoproteiny pp65 (produkt genu *UL83* CMV). Ze względu na pewne ograniczenia tej metody, od kilku lat z powodzeniem wykorzystywana jest w tym celu technika real-time PCR [12, 24]. Według Zaleceń Europejskiej Grupy Przeszczepiania Komórek Hematopoetycznych (European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation; EBMT) u biorców komórek krwiotwórczych zalecane jest monitorowanie DNAemii dwa razy w tygodniu, co najmniej do setnego dnia po zabiegu przeszczepienia [40]. Wykrycie DNA CMV w surowicy pacjenta oraz obserwowanie narastania wirerii umożliwia zastosowanie terapii wyprzedzającej przed pojawieniem się objawów klinicznych zakażenia. Oznaczenia ilościowe umożliwiają także ocenę skuteczności zastosowanej terapii przeciwwirusowej [8, 35].

Technika real-time PCR znalazła również zastosowanie w wykrywaniu oraz genotypowaniu wirusa brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus; HPV). Ze względu na wagę problemu dostępnych jest obecnie wiele testów komercyjnych pozwalających na detekcję oraz różnicowanie poszczególnych typów HPV [1]. Wykrycie wysokoonkogennych typów wirusa umożliwia wczesną identyfikację ryzyka rozwoju raka szyjki macicy lub też nowotworów głowy i szyi oraz wczesne podjęcie leczenia rozpoznanych zmian [21, 31].

4. Wykorzystanie real-time PCR w wirusologicznych badaniach naukowych

W badaniach naukowych technika real-time PCR wykorzystywana jest do wykrywania i oznaczania ilości genomów wirusów, nie objętych rutynowymi procedurami diagnostycznymi, badania ekspresji wirusowych genów czy też do wykrywania mutacji punktowych w obrębie genomu wirusów.

Ponieważ większość firm skupia się przede wszystkim na projektowaniu zestawów wykrywających najpopularniejsze patogeny wirusowe, jest wciąż duża grupa wirusów w odniesieniu do których brak jest na rynku stosownych testów diagnostycznych. Istnieje wówczas możliwość zaprojektowania, optymalizacji czy też walidacji własnej metody opartej na technice

real-time PCR, wykrywającej sekwencję genetyczną konkretnego wirusa. Przykładem może być badanie obecności i poziomu wirerii ludzkich adenowirusów (HAdV) u pacjentów z zaburzeniami odporności [4, 33]. Choć kliniczne znaczenie zakażeń HAdV wśród osób poddanych immunosupresji zostało wielokrotnie opisane, procedury monitorowania DNA adenowirusów nie zostały dotychczas ujęte w schemat postępowania potransplantacyjnego [34]. Wykorzystanie techniki qPCR umożliwia poznanie zmian liczby kopii wirusa na mililitr materiału badanego w czasie trwania potencjalnego leczenia, na podstawie czego można wnioskować o skuteczności zastosowanej terapii [33, 44]. Biorąc pod uwagę ilościowy wynik badania łatwiej jest podjąć decyzję o zmniejszeniu dawek leków przeciwwirusowych przy pojawieniu się skutków ubocznych lub o zmianie leczenia na skuteczniejsze [27, 44].

Podobna zależność istnieje także w przypadku prowadzenia molekularnego nadzoru epidemiologicznego nad wirusami grypy, których duża zmienność sprawia, że opracowywanie nowych reakcji PCR z nowymi zestawami starterów i sond pozostaje stale aktualną potrzebą [37, 39]. Większość dostępnych testów komercyjnych skupia się jedynie na rozróżnianiu typów wirusa A i B, ewentualnie włączeniu do tego schematu wykrywania wyłącznie jednego podtypu wirusa, zwykle A(H5N1) lub A(H1N1)pdm09 [30, 38]. Z epidemiologicznego punktu widzenia niezbędne jest również wykrywanie pozostałych wariantów wirusa grypy krążących w populacji na danym terenie, przy czym testy opracowane samodzielnie w laboratoriach referencyjnych mogą mieć zastosowanie zarówno do bezpośredniego badania próbek klinicznych, jak i do wstępnej identyfikacji izolowanych szczepów wirusa grypy [17, 39].

Analizę ekspresji genu za pomocą metody real-time PCR można przeprowadzić na dwa sposoby. Sposób bezwzględny pozwala określić początkową ilość matrycy np. liczbę kopii badanego genu w komórce. Amplifikacja matrycy uzyskanej w trakcie odwrotnej transkrypcji pozwala określić ilość cDNA w badanej próbce. Jeżeli jednak badamy zmianę ekspresji w obecności różnych czynników lub wprowadzonych genów należy przeprowadzić analizę względną, której wynik porównywany jest do próby kontrolnej [6]. Docelowy gen zostaje powielany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej cDNA oraz gen referencyjny (tzw. „housekeeping gene”), którego poziom ekspresji jest stały we wszystkich komórkach. Najczęściej wykorzystywanymi genami referencyjnymi są ulegające konstytutywnej ekspresji geny metabolizmu podstawowego m.in. gen dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego, gen β -aktyny, gen β 2-mikroglobuliny oraz geny 18S i 28S rybosomalnego RNA [7]. Otrzymany wynik, podawany jako procent zmiany ekspresji badanego genu w danej próbce w stosunku do przyjętej 100% ekspresji genu referencyjnego

w próbie kontrolnej, pokazuje pewien obraz rzeczywistego poziomu transkrypcji w komórce. W wirusologii, analiza ekspresji genów jest wykorzystywana do badania patogenezy zakażeń wirusowych oraz odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie [45].

Real-time PCR pozwala także na analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism; SNP). Do wykrywania pojedynczych zmian wykorzystuje się analizę HRM, która polega na monitorowaniu zachowania wcześniej zamplifikowanych fragmentów DNA w trakcie denaturacji. Porównanie profili topnienia poszczególnych fragmentów kwasów nukleinowych pozwala na selekcję fragmentów wykazujących różnice w przebiegu denaturacji, co odzwierciedla zmiany w sekwencji DNA [32, 41]. Technika HRM wykorzystywana jest do badania zmienności genetycznej m.in. wirusów grypy czy też HIV [5, 20]. Wirusy grypy wykazują znaczną zmienność genetyczną na skutek zmian atygenowych. W następstwie mutacji punktowych określanymi jako przesunięcie (dryf antygenowy) lub reasortacji genetycznej (skok antygenowy) powstają nowe warianty antygenowe. Powoduje to utrudnienia w diagnostyce oraz jest przyczyną powstania nowych, wysoce zakaźnych podtypów wirusa. Real-time PCR wykorzystujący technikę HRM pozwala na szybkie różnicowanie istniejących wirusów grypy oraz wykrywanie nowo pojawiających się wariantów klinicznych [23]. Wysoką zmienność genetyczną spowodowaną m.in. szybkim tempem replikacji oraz spontanicznymi i licznymi mutacjami punktowymi wykazuje także HIV. Zmiany w sekwencji genomu tego wirusa mogą powodować nieskuteczność stosowanej terapii antyretrowirusowej; są też przyczyną ciągłych niepowodzeń w opracowaniu skutecznej szczepionki przeciwko HIV. Wykrywanie zmienności genetycznej HIV przy użyciu techniki HRM jest stosowane coraz częściej, zwłaszcza iż metoda ta jest tańsza niż sekwencjonowanie [42].

Przy korzystaniu z testów real-time PCR opracowywanych samodzielnie w laboratoriach należy jednak pamiętać, że zgodnie z załącznikiem II do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dn. 12.01.2011 (Dz.U. nr 16 poz. 75), część wirusów należy do patogenów z wykazu A (HIV, HTLV, HBV, HCV) lub też wykazu B (CMV, wirus różyczki), a więc wszystkie testy stosowane do diagnostyki zakażeń nimi u człowieka muszą posiadać znak CE/IVD [48]. Obostrzenie to nie dotyczy oczywiście zestawów wykorzystywanych wyłącznie w celach naukowych.

5. Podsumowanie

Metoda qPCR umożliwia obserwację przebiegu reakcji w trakcie jej trwania oraz pozwala określić liczbę kopii DNA w próbce, co znalazło szerokie zastosowanie

w wirusologii; zarówno w diagnostyce, jak i w badaniach naukowych. Real-time PCR pozwala nie tylko na wykrywanie wirusów, ale również oznaczenia poziomu wirerii w różnych materiałach klinicznych. Oznaczenie liczby kopii wirusa jest ważne przy monitorowaniu terapii zakażeń HIV, HBV, HCV czy też CMV, a obserwowany spadek wirerii świadczy o skuteczności wdrożonego leczenia. W badaniach naukowych real-time PCR wykorzystywany jest do analizy ekspresji genów oraz analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów. Użycie techniki qPCR połączonej z analizą HRM ze względu na swą czułość oraz niezbyt wysokie koszty jest coraz powszechniej stosowane do badania zmienności genetycznej m.in. wirusów grypy oraz HIV.

Piśmiennictwo

1. Abreu A.L., Souza R.P., Gimenes F., Consolaro M.E.: A review of methods for detect human papillomavirus infection. *Virology*, **9**, 262 (2012)
2. Chabros Ł., Przybylski M., Dzieciatkowski T., Łuczak M.: Modyfikacja i optymalizacja metod PCR do wykrywania regionu MIE ludzkiego herpeswirusa typu 5. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **60**, 79–86 (2008)
3. Chevalier S.: Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 116–121 (2011)
4. Claas E.C., Schilham M.W., de Brouwer C.S., Hubacek P., Echavarría M., Lankester A.C., van Tol M.J., Kroes A.C.: Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1738–1744 (2005)
5. Cousins M.M., Ou S.S., Wawer M.J., Munshaw S., Swan D., Magaret C.A., Mullis C.E., Serwadda D., Porcella S.F., Gray R.H., Quinn T.C., Donnell D., Eshleman S.H., Redd A.D.: Comparison of a high-resolution melting assay to next-generation sequencing for analysis of HIV diversity. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3054–3059 (2010)
6. Deepak S., Kottapalli K., Rakwal R., Oros G., Rangappa K., Iwahashi H., Masuo Y., Agrawal G.: Real-time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current Genomics*, **8**, 234–251 (2007)
7. Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A.: Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, **37**, 112–119 (2004)
8. Dzieciatkowski T., Przybylski M., Tomaszewska A., Rokicka M., Łuczak M.: Comparison of two methods used for monitoring low-copy cytomegalovirus infection in a patient with chronic myeloid leukemia after unrelated umbilical cord blood transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **55**, 199–203 (2007)
9. Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J., Klapper P.E.: Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 559–570 (2000)
10. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F.: Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 165–256 (2006)
11. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Gonçalves F.L. Jr, Häussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J.: Peginterferon

- alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982 (2002)
12. Gimeno C., Solano C., Latorre J.C., Hernández-Boluda J.C., Clari M.A., Remigia M.J., Furió S., Calabuig M., Tormo N., Navarro D.: Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3311–3318 (2008)
 13. González V., Gomes-Fernandes M., Bascuñana E., Casanovas S., Saludes V., Jordana-Lluch E., Matas L., Ausina V., Martró E.: Accuracy of a commercially available assay for HCV genotyping and subtyping in the clinical practice. *J. Clin. Virol.* **58**, 249–253 (2013)
 14. Halota W., Flisiak R., Boroń-Kaczmarek A., Juszczyk J., Cianciara J., Pawłowska M., Simon K., Małkowski P.: Standardy leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C. Rekomendacje Polskiej Grupy Ekspertów HCV, 2011 rok. *Przegl. Epidemiol.* **66**, 83–88 (2012)
 15. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio-technology*, **10**, 413–417 (1992)
 16. Horban A., Podlasiński R., Cholewińska G., Wsiercińska-Drapała A., Knysz B., Inglot M., Szymczak A.-red: Zalecenia Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS 2012: Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV. *Agencja Wydawnicza EkoPress*, Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS, Warszawa–Wrocław, 2012, s. 59–60
 17. Huber I., Campe H., Sebah D., Hartberger C., Konrad R., Bayer M., Busch U., Sing A.: A multiplex one-step real-time RT-PCR assay for influenza surveillance. *Euro Surveill.* **16**, 19798 (2011)
 18. Jungkind D.: Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction: our past, our present, our future. *J. Clin. Virol.* **20**, 1–6 (2001)
 19. Juszczyk J., Boroń-Kaczmarek A., Cianciara J., Flisiak R., Gładysz A., Halota W., Kryczka W., Małkowski P., Pawłowska M., Simon K.: Zalecenia terapeutyczne na rok 2013: Leczenie przeciwwirusowe przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Przegl. Epidemiol.* **67**, 383–391 (2013)
 20. Kalthoff D., Beer M., Hoffmann B.: High resolution melting analysis: rapid and precise characterisation of recombinant influenza A genomes. *Viol. J.* **10**, 284 (2013)
 21. Kerr D.A., Pitman M.B., Sweeney B., Arpin R.N. 3rd, Wilbur D.C., Faquin W.C.: Performance of the Roche Cobas 4800 high-risk human papillomavirus test in cytologic preparations of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Cytopathol.* **122**, 167–174 (2014)
 22. Klein D.: Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.* **8**, 257–260 (2002)
 23. Lin J.H., Tseng C.P., Chen Y.J., Lin C.Y., Chang S.S., Wu H.S., Cheng J.C.: Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis. *Clin. Microbiol.* **46**, 1090–1097 (2008)
 24. Ljungman P., de la Camara R., Cordonnier C., Einsele H., Engelhard D., Reusser P., Styczynski J., Ward K.: Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.* **42**, 227–240 (2008)
 25. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1292–1305 (2002)
 26. Mackay I.M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 190–212 (2004)
 27. Matthes-Martin S., Feuchtinger T., Shaw P.J., Engelhard D., Hirsch H.H., Cordonnier C., Ljungman P.: European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transplant Infect. Dis.* **14**, 555–563 (2012)
 28. Miller W.C., Powers K.A., Smith M.K., Cohen M.S.: Community viral load as a measure for assessment of HIV treatment as prevention. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 459–464 (2013)
 29. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* **262**, 56–61, 64–65 (1990)
 30. Novak-Weekley S.M., Marlowe E.M., Poulter M., Dwyer D., Speers D., Rawlinson W., Baleriola C., Robinson C.C.: Evaluation of the Cepheid Xpert Flu Assay for rapid identification and differentiation of influenza A, influenza A 2009 H1N1, and influenza B viruses. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1704–1710 (2012)
 31. Preisler S., Rebolj M., Untermann A., Ejegod D.M., Lynge E., Rygaard C., Bonde J.: Prevalence of human papillomavirus in 5,072 consecutive cervical SurePath samples evaluated with the Roche Cobas HPV real-time PCR assay. *PLoS One*, **8**, 59765 (2013)
 32. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T.: High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, **8**, 597–608 (2007)
 33. Rynans S., Dzieciatkowski T., Basak G.W., Snarski E., Przybylski M., Wróblewska M., Jędrzejczak W.W., Młynarczyk G.: Human adenovirus infection in patients subjected to allogeneic haemopoietic stem cell transplantation – a three year single centre study. *Acta Virol.* **56**, 85–87 (2012)
 34. Rynans S., Dzieciatkowski T., Młynarczyk G.: Zakażenia adenowirusami u osób z niedoborami odporności. *Post. Hig. Med. Dośw.* **67**, 964–972 (2013)
 35. Sahin D.G., Gunduz E., Kasifoglu N., Akay O.M., Us T., Gulbas Z.: Cytomegalovirus DNAemia detected with real-time polymerase chain reaction in hematopoietic stem cell transplant patients. *Adv. Ther.* **30**, 784–91 (2013)
 36. Speers D.J.: Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin. Biochem. Rev.* **27**, 39–51 (2006)
 37. Stefańska I., Romanowska M., Brydak L.B.: Metody wykrywania wybranych wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **66**, 452–460 (2012)
 38. Stefańska I., Dzieciatkowski T., Brydak L.B., Romanowska M.: Zastosowanie reakcji duplex real-time PCR do identyfikacji wirusów grypy podtypu A(H1)pdm09 i A(H3). *Med. Dośw. Mikrobiol.* **64**, 129–137 (2012)
 39. Stefańska I., Dzieciatkowski T., Brydak L.B., Romanowska M.: Application of three duplex real-time PCR assays for simultaneous detection of human seasonal and avian influenza viruses. *Arch. Virol.* **158**, 1743–1753 (2013)
 40. Tomblyn M., Chiller T., Einsele H., Gress R., Sepkowitz K., Storek J., Wingard J.R., Young J.A., Boeckh M.J.: Center for International Blood and Marrow Research; National Marrow Donor program; European Blood and Marrow Transplant Group; American Society of Blood and Marrow Transplantation; Canadian Blood and Marrow Transplant Group; Infectious Diseases Society of America; Society for Healthcare Epidemiology of America; Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada; Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**, 1143–1238 (2009)
 41. Tong S.Y., Giffard P.M.: Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3418–3421 (2012)

42. Towler W.I., James M.M., Ray S.C., Wang L., Donnell D., Mwatha A., Guay L., Nakabiito C., Musoke P., Jackson J.B., Eshleman S.H.: Analysis of HIV diversity using a high-resolution melting assay. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **26**, 913–918 (2010)
43. Trombley Hall A., McKay Zovanyi A., Christensen D.R., Koehler J.W., Devins Minogue T.: Evaluation of inhibitor-resistant real-time PCR methods for diagnostics in clinical and environmental samples. *PLoS One*, **8**, 73845 (2013)
44. Ulrych E.E., Dzieciatkowski T., Przybylski M., Zduńczyk D., Boguradzki P., Torosian T., Waszczuk-Gajda A., Rynans S., Wróblewska M., Jędrzejczak W.W., Młynarczyk G.: Disseminated adenovirus disease in immunocompromised patient successfully treated with oral ribavirin – a case report. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **59**, 473–477 (2011)
45. Valasek M.A., Repa J.J.: The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* **29**, 151–159 (2005)
46. Watzinger F., Ebner K., Lion T.: Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol. Aspects. Med.* **27**, 254–298 (2006)
47. Wilhelm J., Pingoud A.: Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem.* **4**, 1120–1128 (2003)
48. Internetowy System Aktów Prawnych 14.11.2014 (online) isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20110160075