

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo – nova metoda za spremljanje poteka in zdravljenja virusnih okužb

Quantitative polymerase chain reaction – a novel method for monitoring the course and treatment of viral diseases

Katja Seme*, Mario Poljak**

Ključne besede
virusne bolezni
polimerazna verižna reakcija

Key words
virus diseases
polymerase chain reaction

Izvleček. Verižna reakcija s polimerazo je relativno nova metoda sinteze nukleinskih kislin *in vitro*, s katero lahko v kratkem času eksponentno namnožimo določeni manjši odsek DNA ali RNA. Čeprav verižno reakcijo s polimerazo danes v diagnostični mikrobiologiji uporabljamo predvsem za dokazovanje številnih povzročiteljev okužb, je s kvantitativnimi različicami metode mogoče ugotoviti tudi količino določenega mikroorganizma v kliničnem vzorcu. Namen prispevka je predstaviti teoretične osnove kvantitativnih različic verižne reakcije s polimerazo, najbolj pogoste probleme in težave, ki se pojavljajo pri izvedbi te metode, ter dva nedavno razvita komercialno dostopna diagnostična kompleta za kvantitativno določanje genoma virusa hepatitisa C in genoma virusa HIV. Oba diagnostična kompleta sta v naših in tujih pilotskih raziskavah že pokazala veliko uporabnost pri spremljanju poteka in zdravljenja okužbe z omejenima virusoma.

Abstract. The polymerase chain reaction is a relatively new *in vitro* method, which uses enzymatic synthesis to amplify, in an exponential manner, specific DNA or RNA sequences. The polymerase chain reaction can be used both to detect the presence of microbial sequences and to provide a quantitative evaluation of the number of copies of the genome present. This article presents a brief overview of the principles of quantitative polymerase chain reaction, summarizes some of the application problems, and describes two recently developed simple and rapid assays for quantitative detection of hepatitis C virus and HIV RNA in serum and plasma samples. Both assays were found to be valuable tools for determining the natural history of infection, dissecting viral pathogenesis and monitoring the efficacy of therapeutic interventions.

Uvod

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*) je trenutno najbolj občutljivejša in najbolj uporabljana metoda molekularne mikrobiologije, ki je v zelo kratkem času revolucionarno spremenila način odkrivanja virusnih in bakterijskih okužb (1, 2). Dokazovanje mikroorganizmov s PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju za določen mikroorganizem specifičnega, majhnega odseka njegovega dednega materiala (največkrat od 100 do 1000 baznih parov) s pomočjo encima termostabilne polimeraze DNA. Z več različicami metode je mogoče določeni odsek tarčne DNA ali RNA v nekaj urah pomnožiti več kot milijonkrat. Na ta način dobimo zadostno količino nukleinske kisline za nadaljnje molekularne analize, s katerimi dokončno potrdimo specifičnost pomnoženega genomskega odseka (1, 2).

*Asist. mag. sc. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

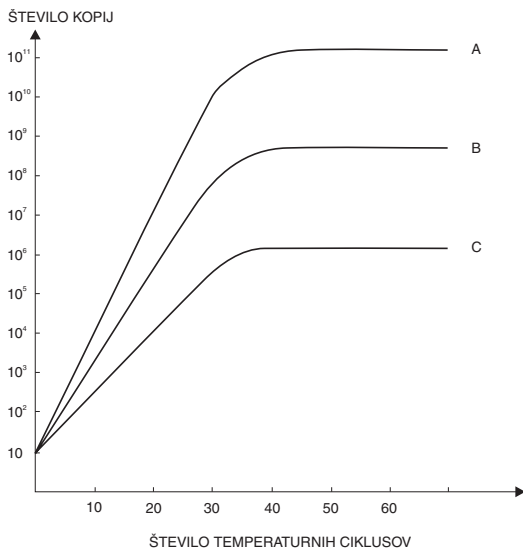
**Doc. dr. sc. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

PCR uporabljamo danes v diagnostični mikrobiologiji predvsem za dokazovanje **prisotnosti** mikroorganizmov v kliničnih vzorcih. Te t. i. kvalitativne različice PCR so omogočile podrobnejše preučevanje številnih mikroorganizmov, njihove genetske različnosti, načina prenosa in patogeneze mikrobnih okužb (1). Več raziskovalnih skupin je v zadnjem času razvilo tudi t. i. kvantitativne različice PCR, s katerimi je poleg prisotnosti določenega mikroorganizma v kliničnem vzorcu mogoče ugotoviti tudi njegovo **količino** (3–7). Namen prispevka je na kratko predstaviti teoretične osnove kvantitativne PCR, načine izvajanja metode ter dva primera možne uporabe v mikrobiologiji, in sicer v spremljanju poteka in zdravljenja okužbe z virusom hepatitisa C in virusom HIV.

Teoretične osnove kvantitativne verižne s polimerazo reakcije

Za merjenje količine mikroorganizmov, prisotnih v kliničnem vzorcu, lahko uporabimo več pristopov, od neposrednega štetja mikroorganizmov do posrednega merjenja količine specifičnih mikrobnih beljakovin, maščob, encimov ali nukleinskih kislin. Zaradi stalnega in nespremenljivega razmerja med količino mikroorganizma in količino njegove dedne zasnove (en mikroorganizem = ena ali dve kopiji genoma), je merjenje količine mikrobnega genoma po mnenju številnih avtorjev najbolj objektivni posredni kazalec količine določenega mikroorganizma (8–10). Kvantitativna PCR je trenutno najbolj natančna metoda, s katero lahko ugotovimo število ali količino določenega mikroorganizma v kliničnem vzorcu z merjenjem količine njegove dedne zasnove (10). Poleg tega je kvantitativna PCR tudi najbolj objektivna metoda za spremljanje podvojevalne aktivnosti določenega mikroorganizma; le-to dosežemo z merjenjem prepisovalne (transkripcijske) aktivnosti določenih mikrobnih genov, to je z merjenjem količine specifičnih sporočilnih RNA (mRNA) (10, 11).

Kljub objektivnosti in natančnosti je kvantitativna PCR, na žalost, še vedno ena od tehnično najbolj zahtevnih metod za merjenje količine mikroorganizmov (12). Zahtevnost kvantitativne PCR tiči v sami teoretični zasnovi reakcije pomnoževanja. Izhodno količino dedne zasnove določenega mikroorganizma v kliničnem vzorcu je namreč treba izračunati iz količine namnoženega majhnega delca genoma (PCR-pridelek), ki jo izmerimo z različnimi metodami po končani reakciji. Po izkušnjah večine raziskovalcev je izpeljava natančnega matematičnega obrazca, ki bi nam omogočal navedeni izračun, najtežji teoretični in praktični problem kvantitativne PCR (10, 11). PCR je namreč verižna reakcija, v kateri se v idealnih pogojih majhni, značilni delec dednega materiala namnožuje tako, da količina PCR-pridelka naraste dvakrat v vsakem temperaturnem ciklusu reakcije (1, 2). Porast količine PCR-pridelka je torej teoretično eksponenten in ne linearen kot pri večini encimskih procesov (1). Poleg tega, iz zaenkrat še nedokončno pojasnenih razlogov, praktično dosežemo teoretični eksponenten porast količine PCR-pridelka le v prvih 20 do 25 temperaturnih ciklikih. V kasnejših temperaturnih ciklikih namreč učinkovitost pomnoževanja (angl. *amplification efficiency*) pada in se pomnoževanje dokončno ustavi po približno 40 do 50 temperaturnih ciklikih (slika 1) (1, 2). Zaradi izredne občutljivosti metode lahko že najmanjše spremembe reakcijskih pogojev privedejo do pomembnih sprememb v učinkovitosti pomnoževanja in tako do nastanka zelo različnih količin PCR-pridelka iz sicer enake izhodne količine dedne zasnove



Slika 1. Grafični prikaz teoretičnega naraščanja količine tarčnega odseka mikrobnega genoma oz. PCR-pridelka v odvisnosti od števila ciklusu PCR pri različnih učinkovitostih pomnoževanja. Iz izhodnih 10 kopij mikrobnega genoma nastane po približno 40 temperaturnih ciklusih pri 100 % učinkovitosti pomnoževanja 100 milijard kopij (krivulja A), pri 75 % učinkovitosti 316,2 milijona kopij (krivulja B) in pri 50 % učinkovitosti pomnoževanja en milijon kopij (krivulja C).

(slika 1). Zaradi vseh navedenih razlogov je torej izpeljava obrazca, ki bi natančno matematično opredelil celotno krivuljo pomnoževanja PCR-pridelka, skorajda nemogoča (10, 11). Ker je krivulja pomnoževanja PCR-pridelka matematično najlažje opredeljiva v zgodnjih ciklusih pomnoževanja, in ker je takrat vpliv različnih dejavnikov na učinkovitost pomnoževanja najmanjši, je večina raziskovalcev dosegla zadovoljive in primerljive rezultate kvantitativne PCR le z omejevanjem števila ciklusu pomnoževanja z običajnih 35 do 40 na največ 25. S tem ukrepom je na žalost pomembneje znižana občutljivost kvantitativne reakcije v primerjavi s kvalitativnimi različicami PCR (9, 10).

Prvi pogoj za uspešno izvajanje kvantitativne PCR je pravilen izbor metode za natančno in ponovljivo merjenje količine nastalega PCR-pridelka (10, 11). Najstarejši postopek je uporaba radioaktivno označenih začetnih oligonukleotidov ali enega od deoksinukleotidtrifosfatov. Po končani PCR in ločevanju delcev DNA po velikosti z elektroforezo v gelu, količino v PCR-pridelek vgrajenega radioaktivnega označevalca neposredno izmerimo s scintilacijskim števcem. Osnovni pomanjkljivosti metode sta neposredno delo z nevarnimi radioaktivnimi snovmi ter visoka cena (10).

Veliko bolj natančno je posredno merjenje količine nastalega PCR-pridelka s pomočjo različnih hibridizacijskih metod (1). Tako npr. pri hibridizaciji po Southernu ali dot-blot hibridizaciji PCR-pridelke po končanem pomnoževanju najprej prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko membrano z uporabo klasičnega (Southernovega) ali vakuumske-

ga načina prenosa. Nato na membrani izvedemo hibridizacijo z uporabo kratkega značilnega delca DNA t. i. DNA-lovke, ki je skladna z določenim delom PCR-pridelka in je radioaktivno ali neradioaktivno označena. Intenzivnost radioaktivnega (madež na filmu, občutljivem za sevanje) ali neradioaktivnega signala (barvni madež na membrani), ki je sorazmerna količini PCR-pridelka, izmerimo neposredno z gostotnim »skeniranjem« ali posredno (po eluciji v ustrezni raztopini) s scintilacijskim števcem ali spektrofotometrično (1). Nekatere pomanjkljivosti navedenih klasičnih hibridizacijskih metod, kot so visoka cena, nezmožnost avtomatizacije in standardizacije ter istočasne obdelave večjega števila vzorcev, bo verjetno v prihodnosti odpravil trenutno najbolj obetaven sistem hibridizacije v mikrotitracijskih ploščicah t. i. encimsko oligonukleotidni test (1). Pri tej metodi PCR največkrat izvajamo z uporabo neradioaktivno (npr. z biotinom) označenih začetnih oligonukleotidov. Po končanem pomnoževanju prenesemo PCR-pridelek v vdolbinico mikrotitracijske ploščice, katere notranjost je prekrita z neoznačeno DNA-sondo in v kateri poteka hibridizacija. V primeru uspešne hibridizacije prikažemo vezani, z biotinom označeni PCR-pridelek, z uporabo visokospecifičnega avidina ali antibiotinskih protiteles, ki so označena z encimom, alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo. Po dodatku substrata se pri pozitivni reakciji vsebina vdolbinice obarva. Intenzivnost barve, ki jo merimo spektrofotometrično, je sorazmerna količini PCR-pridelka (1).

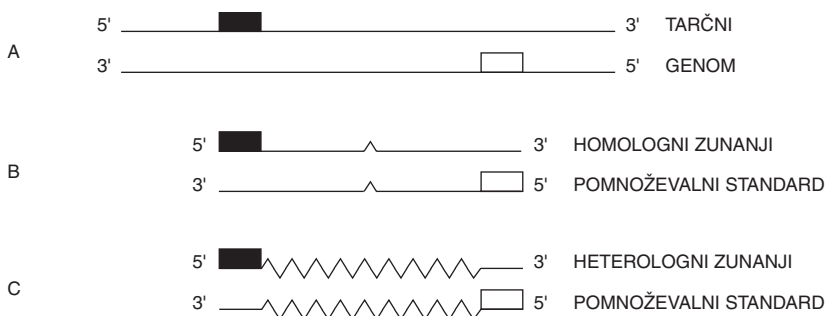
Drugi pomembni pogoj za uspešno izvajanje kvantitativne PCR je izbor ustreznega postopka za natančen nadzor učinkovitosti pomnoževanja tarčnega odseka mikrobnega genoma kot najpomembnejše spremenljivke kvantitativne PCR (3, 11). Že v zgodnjih raziskavah so ugotovili, da je tak nadzor mogoč le s hkratnim pomnoževanjem dveh različnih genomskih odsekov: tarčnega odseka mikrobnega genoma in t. i. pomnoževalnega standarda (angl. *internal amplification standard*) (3). Pomnoževalni standard je manjši odsek nukleinske kisline znanega nukleotidnega zaporedja, ki je v reakciji prisoten v znani izhodni količini. Po končanem pomnoževanju najprej ovrednotimo učinkovitost pomnoževanja posamezne reakcije, kar dosežemo s primerjanjem izhodne količine standarda ter količine namnoženega standarda. Čim večje je razmerje, tem večja je učinkovitost pomnoževanja. Izhodno količino mikroorganizma, prisotnega v kliničnem vzorcu, nato izračunamo iz izmerjene količine namnoženega tarčnega odseka mikrobnega genoma s posebnim matematičnim obrazcem, upoštevajoč predhodno določeno učinkovitost pomnoževanja (3, 10, 11).

Kot pomnoževalni standard lahko uporabljamo nukleinske kisline že prisotne v kliničnem vzorcu (notranji pomnoževalni standard) ali manjše odseke nukleinskih kislin, ki jih v klinični vzorec dodamo pred začetkom preiskave (zunanji pomnoževalni standard) (11). Kot notranje pomnoževalne standarde največkrat uporabljamo različne mRNA genov z domnevno nenehno in vedno enako stopnjo izražanja, kot so npr. geni za različne ribosomalne beljakovine, pomembne presnovne encime ali β 2-mikroglobulin. Prednost uporabe notranjih pomnoževalnih standardov pred zunanjimi standardi je njihova prisotnost v vseh fazah kvantitativne PCR, od osamitve nukleinskih kislin do dokazovanja PCR-pridelka ter nižja cena postopka. Glavna pomanjkljivost uporabe notranjih standardov je v tem, da zaradi uporabe različnih parov začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje tarčnega odseka mikrobnega genoma in notranjega pomnoževalnega standarda

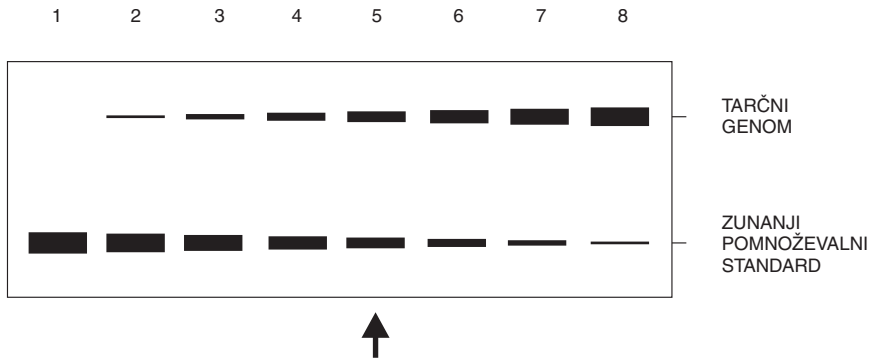
ter zaradi različne velikosti in sestave PCR-pridelkov ni mogoče iz izmerjene učinkovitosti pomnoževanja notranjega standarda popolnoma zanesljivo sklepati na učinkovitost pomnoževanja tarčnega odseka mikrobnega genoma (3, 10, 11).

Za razliko od notranjih pomnoževalnih standardov, ki so že prisotni v kliničnem vzorcu, je treba zunanji pomnoževalni standard dodati v klinični vzorec pred začetkom kvantitativne PCR oz. najbolje že pred začetkom osamitve nukleinskih kislin (11). Zunanje pomnoževalne standarde lahko pripravimo s klasično DNA-rekombinantno tehnologijo ali pogosteje z aparati za sintezo manjših odsekov nukleinskih kislin. Ker zunanji pomnoževalni standard dodajamo v reakcijo sami, je za razliko od dela z notranjimi pomnoževalnimi standardi izhodna količina ter sestava pomnoževalnega standarda vedno natančno znana. Njegova dolžina ter termodinamske lastnosti (temperatura tališča) so največkrat popolnoma enake tarčnemu odseku mikrobnega genoma. Med zunanji pomnoževalnimi standardi ločimo t. i. homologne in heterologne standarde (3, 10, 11).

Homologni zunanji pomnoževalni standardi imajo nukleotidno zaporedje skoraj popolnoma enako nukleotidnemu zaporedju tarčnega odseka mikrobnega genoma (slika 2). Zaradi podobnega nukleotidnega zaporedja prihaja med pomnoževanjem do medsebojnega spajanja pomnoženih delcev zunanjega pomnoževalnega standarda s pomnoženimi komplementarnimi delci tarčnega odseka mikrobnega genoma, kar zavira pomnoževanje enega od njiju, ali enostavneje povedano, standard in tarčni odsek mikrobnega genoma tekmujeta za pomnoževanje – bolj se namnoži tisti, ki ga je v izhodnem vzorcu več (3). Zaradi tekmovanja med standardom in tarčnim odsekom mikrobnega genoma imenujemo različico kvantitativne PCR, v kateri uporabljamo homologne zunanje pomnoževalne standarde, kompetitivna kvantitativna PCR. Da bi po končani reakciji PCR-pridelke nastale s pomnoževanjem standarda, razlikovali od PCR-pridelkov tarčnega odseka mikrobnega genoma, mora nukleotidno zaporedje standarda vsebovati krajšo in-



Slika 2. Shematski prikaz razlik med homolognimi in heterolognimi zunanji pomnoževalnimi standardi. Homologni zunanji pomnoževalni standardi (B) imajo nukleotidno zaporedje skoraj popolnoma enako nukleotidnemu zaporedju tarčnega odseka mikrobnega genoma (A), razlika je le v prisotnosti krajše delecije, insercije ali mesta, ki ga prepozna določen restrikcijski encim, običajno v sredini zaporedja. Heterologni zunanji pomnoževalni standardi (C) imajo skoraj popolnoma različno nukleotidno zaporedje od nukleotidnega zaporedja tarčnega odseka mikrobnega genoma (A); zaporedji sta si enaki le na 5' in 3' koncu (prijemališči začetnih oligonukleotidov). Prijemališča začetnih oligonukleotidov so označena s pravokotniki.



Slika 3. Rezultat kompetitivne kvantitativne PCR po elektroforezi v agaroznem gelu. Kolone 1–8 – rezultati pomnoževanja v reakcijskih posodicah z enako količino vzorca (neznana količina tarčnega odseka mikrobnega genoma) in različnimi znanimi količinami homolognega zunanje pomnoževalnega standarda (serijske razredčine standarda – količina pomnoževalnega standarda je bila največja v prvi reakcijski posodici in najmanjša v zadnji). S puščico je označena kolona, v kateri je bila količina PCR-pridelkov tarčnega odseka mikrobnega genoma enaka količini PCR-pridelka pomnoževalnega standarda (enaka debelina pasov DNA na agaroznem gelu). V pripadajoči reakcijski posodici je bila izhodna količina tarčnega odseka mikrobnega genoma enaka količini dodanega zunanje pomnoževalnega standarda.

sercijo, delecijo ali mesto, ki ga prepozna določen restrikcijski encim. Kompetitivno kvantitativno PCR vedno izvajamo v več reakcijskih posodicah, v katere dodamo enako količino vzorca (neznana količina tarčnega odseka mikrobnega genoma) in različne znane količine homolognega zunanje pomnoževalnega standarda. V reakcijski posodici, v kateri bo po končanem pomnoževanju količina PCR-pridelkov tarčnega odseka mikrobnega genoma enaka količini PCR-pridelka pomnoževalnega standarda (enaka debelina pasov DNA na agaroznem gelu), je bila izhodna količina tarčnega odseka mikrobnega genoma enaka količini dodanega zunanje pomnoževalnega standarda (slika 3) (3, 10, 11).

Heterologni zunanji pomnoževalni standardi imajo za razliko od homolognih standardov skoraj popolnoma različno nukleotidno zaporedje od nukleotidnega zaporedja tarčnega odseka mikrobnega genoma (slika 2) (3). Kljub različni sestavi heterolognega pomnoževalnega standarda ter tarčnega odseka mikrobnega genoma morajo biti njuni dolžini ter termodinamske lastnosti (temperature tališča) približno enake. Nukleotidni zaporedji heterolognega pomnoževalnega standarda ter tarčnega odseka mikrobnega genoma sta največkrat enaka le na 5' in 3' koncu (prijemališča začetnih oligonukleotidov), zato da oba lahko pomnožujemo z istim parom začetnih oligonukleotidov (slika 2). Ker sta nukleotidni zaporedji standarda in tarčnega odseka med prijemališčema začetnih oligonukleotidov različni (nekomplementarni), med pomnoževanjem ne pride do medsebojnega spajanja pomnoženih delcev standarda s pomnoženimi delci tarčnega odseka mikrobnega genoma. Zato se pomnoževalni standard in tarčni odsek mikrobnega genoma pomnožujeta neodvisno drug od drugega, brez medsebojnega zaviranja. Ker standard in tarčni odsek ne tekmujeta za pomnoževanje, imenujemo različico kvantita-

tivne PCR, v kateri uporabljamo heterologne zunanje pomnoževalne standarde, nekompetitivna kvantitativna PCR. Nekompetitivna kvantitativna PCR, za razliko od kompetitivne, poteka le v eni reakcijski posodici, izhodno količino tarčnega mikrobnega genoma izračunamo matematično iz znane količine dodanega heterolognega zunanjega standarda pomnoževanja ter izmerjenih količin namnoženega standarda in tarčnega odseka mikrobnega genoma (3, 10, 11).

Diagnostična različica kvantitativne verižne reakcije s polimerazo

Čeprav je eksplozija kvantitativnih PCR-raziskav v zadnjih treh letih omogočila povsem nov način raziskovanja virusov, prenos kvantitativne PCR iz raziskovalnih v diagnostične virološke laboratorije ne poteka tako hitro in enostavno, kot bi si mnogi želeli. Največjo skrb še vedno zbujejo rezultati do sedaj opravljenih primerjalnih študij med različnimi laboratoriji v svetu, ki so pogosto nedvomno dokazale neprimerljivost rezultatov, dobljenih z različnimi raziskovalnimi različicami kvantitativne PCR na sicer enakih kliničnih vzorcih, ter vse pogostejši dokazi o neenaki učinkovitosti istih začetnih oligonukleotidov za genom določenega virusa v različnih delih sveta (13–15). Podobne raziskave so tudi pokazale, da raziskovalne različice kvantitativne PCR niso uporabne za testiranje večjega števila vzorcev v kratkem času (pomembna značilnost diagnostičnega laboratorija), predvsem zaradi tehnične zapletenosti, zamudnosti ter visoke cene (10, 11).

Večino navedenih problemov v diagnostičnih viroloških laboratorijih pripisujejo prehitremu razvoju metode, ki mu ni sledil dovolj hiter razvoj ustreznih standardiziranih kemikalij, služb za nadzor nad kvaliteto dela ter zlasti kontrolnih vzorcev (kliničnih vzorcev z natančno znano in preverjeno količino določenega virusa) (16). Pri diagnostični interpretaciji rezultatov raziskovalnih različic kvantitativne PCR je zato, po mnenju večine avtorjev, potrebna skrajna previdnost, dokler ni razvitih omenjenih kontrolnih mehanizmov (9). Iz istih razlogov mora biti zaenkrat izvajanje raziskovalnih različic kvantitativne PCR v diagnostične namene omejeno samo na maloštevilne laboratorije z visoko izurjenim laboratorijskim osebjem (9, 16).

Kmalu po odkupu vseh tehničnih, patentnih in prodajnih pravic za uporabo PCR na vseh področjih biomedicine, vključno z virologijo, je družba Hoffman-La Roche prevzela razvoj visoko standardiziranih PCR-diagnostičnih kompletov, ki so odprli možnost širše in zanesljivejše uporabe tudi za kvantitativno PCR. Eden od rezultatov raziskovalnih naporov raziskovalcev omenjene družbe sta standardizirana testa za določanje količine virusne RNA virusa hepatitisa C ter virusa HIV-1 v vzorcih seruma oz. plazme, ki sta se pojavila na evropskem tržišču leta 1995 z zaščitenim imenom Amplicor Monitor® (6, 17).

Testa Amplicor Monitor® temeljita na nekompetitivni kvantitativni PCR, ki jo izvajamo z uporabo sintetskega heterolognega zunanjega pomnoževalnega standarda, ki ima enako dolžino in termodinamske lastnosti kot tarčni odsek virusne RNA (6, 17). Pomnoževalni standard dodajamo v klinični vzorec že pred začetkom osamitve RNA, tako da je prisoten v vseh fazah reakcije. Po končani osamitvi RNA pomnoževalni standard ter tarčni odsek virusne RNA pomnožujemo z istim parom začetnih oligonukleotidov, izbranim v najbolj ohranjenem delu virusnega genoma. Namnožene PCR-pridelke pomnoževal-

nega standarda ter tarčnega odseka virusne RNA dokazujemo ter ločujemo s hibridizacijo z dvema različnima DNA-lovkama (eno specifično za virusni genom in drugo specifično za pomnoževalni standard), ločeno vezanima na steno vdolbinic mikrotitracijske ploščice in z biotin-avidin-peroksidaznim testom za dokazovanje nastalih hibridizacijskih kompleksov. Po merjenju intenzitete spektrofotometričnega signala obeh hibridizacijskih reakcij (vzorčne ter standardne) domnevno količino virusnega genoma, prisotno v kliničnem vzorcu, izračunamo s posebnim matematičnim obrazcem (6, 17).

Po prvih poročilih nekaterih evropskih in ameriških diagnostičnih laboratorijev, ter na osnovi lastnih enoletnih izkušenj lahko rečemo, da sta testa Amplicor Monitor[®] visoko občutljiva in specifična ter uporabna za reševanje določenih diagnostičnih problemov, povezanih z okužbami z virusoma hepatitisa C ter HIV-1. Testa Amplicor Monitor[®] v primerjavi z raziskovalnimi različicami kvantitativne PCR prinašata naslednje prednosti (6, 17):

- večja hitrost izvedbe testa (6 ur) v primerjavi z raziskovalnimi različicami kvantitativne PCR (2–10 dni);
- delo z visoko standardiziranimi in zanesljivimi reagenti;
- testa vsebujeta zanesljiv sistem za zmanjševanje lažnopolitvni rezultatov, ki temelji na uporabi dUTP in N-uracil-glikozilaze (18). Pri tem postopku je v reakcijski mešanici dTTP zamenjan z dUTP, kar privede do nastanka PCR-pridelkov, ki vsebujejo nukleotidno bazo uracil. Če pred PCR dodamo encim N-uracil glikozilazo, ki razgrajuje dvojnovičajne nukleinske kisline z nukleotidno bazo uracilom, bo ta v primeru okužbe uničila PCR-pridelke predhodnih reakcij (ker so le-ti dvojnovičajni in vsebujejo uracil), ne pa tarčne enovijačne RNA, in na ta način preprečila lažnopolitvni rezultat (18);
- testa vsebujeta visoko specifičen in občutljiv sistem za prikaz rezultatov PCR, ki temelji na uporabi encimsko imunskega oligonukleotidnega testa in omogoča popolnoma objektivno vrednotenje rezultatov;
- s testoma je mogoče istočasno določiti količino virusne RNA v velikem številu vzorcev.

Poleg omenjenih testov Amplicor Monitor[®] v letošnjem letu pričakujemo še razvoj podobnih diagnostičnih kompletov za določanje količine genoma virusa hepatitisa B, citomegalovirusa in Epstein-Barr virusa.

Spremljanje poteka in zdravljenja okužbe z virusom hepatitisa C

Odkritju virusa hepatitisa C (HCV) leta 1989 je sledil hiter razvoj posrednih metod za dokazovanje specifičnih protivirusnih protiteles in hkrati z njim tudi razvoj molekularnih metod, ki zaenkrat edine omogočajo neposredno diagnostiko okužbe s HCV (19). Posredni izpopolnjeni serološki testi tretje generacije (presejalni encimsko imunski testi in potrditveni imunoblot testi), ki nam danes v večini primerov omogočajo hitro in zanesljivo diagnostiko okužbe s HCV, so v preteklih petih letih pomembno prispevali k zmanjšanju pojavljanja potransfuzijskih hepatitisov (19–21). Raziskovalne molekularne metode, zlasti PCR, so nam omogočile podrobnejše preučevanje virusa, njegove genetske spremenljivosti, načina prenosa in patogeneze okužbe s HCV ter preizkušanje učinkovitosti različnih protivirusnih sredstev. Kvalitativna PCR, kot osnovna diagnostična me-

toda za neposredno odkrivanje okužbe s HCV in opredelitev kužnosti bolnika, s katero določamo prisotnost HCV RNA v serumu, je danes že nepogrešljiva preiskava v diagnostični obdelavi bolnika s hepatitisom C (19, 20). V Sloveniji se je kvalitativna PCR, podobno kot v drugih razvitih državah, zelo hitro uveljavila kot pomembna diagnostična metoda, kar dokazuje tudi podatek, da smo s to metodo v preteklih treh letih v našem laboratoriju testirali že več kot 2000 serumskih vzorcev (21–25).

Na žalost rezultati novejših raziskav kažejo, da le »preprosto« dokazovanje prisotnosti HCV RNA v serumu (samo pozitiven ali negativen rezultat), kar nam omogoča klasična kvalitativna PCR, ne zadošča več za smotno spremljanje vseh bolnikov s hepatitisom C. Raziskave so namreč pokazale, da je med sicer maloštevilnimi napovednimi dejavniki poteka in zdravljenja hepatitisa C poleg dokaza prisotnosti virusne RNA zelo pomembna tudi natančna določitev njene količine (angl. *viral load*). HCV se najverjetneje podvojuje v jetrnih celicah in je zato biopsijski vzorec jetrnega tkiva, najprimernejša kužnina za dokazovanje prisotnosti in določitev količine HCV RNA (26). Da bi se izognili številnim biopsijskim odvzemom jetrnega tkiva potrebnim za redno spremljanje bolnikov s kroničnim hepatitisom C, so raziskovalci intenzivno iskali najprimernejšo nadomestno kužnino, iz katere bi bilo mogoče z enako zanesljivostjo kot iz jetrnega vzorca sklepati na stanje virusne okužbe. Že v zgodnjih raziskavah so ugotovili, da je virusni genom z enako zanesljivostjo najlažje dokazati v serumskih vzorcih (27). Čeprav so s kvantitativno PCR ugotovili, da je količina HCV RNA v jetrih pri večini bolnikov znatno večja kot v serumu (gram jetrnega tkiva povprečno vsebuje 100- do 10000-krat več kopij virusne RNA kot 1 ml seruma), je razmerje med tema dvema vrednostima vedno proporcionalno (26). Tako pri bolnikih z visokimi vrednostmi HCV RNA v jetrih redno ugotavljamo sorazmerno visoke vrednosti tudi v serumu in nasprotno pri bolnikih z nizkimi vrednostmi HCV RNA v jetrih proporcionalno nizke serumske vrednosti.

Za določevanje količine HCV RNA v serumskih vzorcih je do sedaj razvitih veliko raziskovalnih različic kvantitativne PCR, med katerimi so nekatere kompetitivne in druge nekompetitivne (17, 28–30). Ker še vedno nimamo na voljo standardiziranih kliničnih vzorcev z natančno znano in preverjeno količino virusa (posledica nezmožnosti *in vitro* gojenja HCV), je natančna primerjava rezultatov posameznih raziskovalnih različic kvantitativne PCR skorajda nemogoča. Zato je večino diagnostičnih laboratorijev razveselil pojav Amplicor HCV Monitor[®] testa, kot prvega standardiziranega diagnostičnega kompleta, ki temelji na kvantitativni PCR (17). Po prvih poročilih nekaterih diagnostičnih laboratorijev ter na osnovi lastnih izkušenj lahko rečemo, da je z omenjenim testom možno dokazati okužbo s HCV v relativno širokem razponu serumskih koncentracij virusne RNA, ki sega od 2000 do nekaj milijonov kopij HCV RNA v ml seruma (17).

Prva indikacija za uporabo omenjenega diagnostičnega kompleta je redno spremljanje količine HCV RNA v serumu bolnikov s kroničnim hepatitisom C. V najnovejših raziskovalnih poročilih priporočajo redno določanje HCV RNA pri teh bolnikih najmanj vsakih 6 mesecev. Z rednim spremljanjem količine HCV RNA je namreč mogoče v večini primerov nekaj tednov ali celo mesecev pred kliničnim poslabšanjem bolezni, pred spremembo histološke slike jeter ter pred povečanjem aktivnosti serumskih aminotransferaz napovedati poslabšanje oz. napredovanje kronične okužbe (32).

Druga in najpomembnejša indikacija za uporabo kvantitativne PCR je redno spremljanje protivirusnega zdravljenja bolnikov s kroničnim hepatitisom C. Po mnenju večine avtorjev je kvantitativna PCR trenutno, in bo verjetno tudi v bližnji prihodnosti, edina smiselna metoda za tovrstno spremljanje (28, 29, 33–38). Protivirusnega zdravljenja namreč ni mogoče spremljati s posrednimi virološkimi metodami, kot je določanje specifičnih protivirusnih protiteles v serumu bolnikov, saj so le-ta prisotna v približno enaki koncentraciji več let in celo desetletij po okužbi (8, 33). Določanje aktivnosti serumskih aminotransferaz kot biokemičnega kazalca jetrne okvare so v preteklosti največkrat uporabljali za spremljanje protivirusnega zdravljenja ne-A, ne-B hepatitisa oz. hepatitisa C, vendar so že kmalu ugotovili, da ta kazalec pogosto ni v skladu s prisotnostjo virusnega genoma v jetrih ali v serumu. Velikokrat se je namreč zgodilo, da se je kmalu po začetku protivirusnega zdravljenja aktivnost serumskih aminotransferaz znižala oziroma normalizirala, po prenehanju zdravljenja pa se je ponovno povečala (7, 28, 33, 39, 40). V večini takih primerov so retrogradno ugotovili, da je bilo ves čas zdravljenja mogoče s PCR dokazati prisotnost virusne RNA bodisi v serumu ali v jetrnem tkivu in da je pravzaprav šlo le za lažni občutek o uspešnosti zdravljenja (28, 33, 34, 36, 37, 40). Ker je namen protivirusnega zdravljenja odstranitev ali vsaj pomembnejše znižanje količine virusa v organizmu in ne zdravljenje »hiperaminotransferazemije«, je torej nedvomno treba spremljati protivirusno zdravljenje z virološkimi metodami. Glede na rezultate dosedanjih raziskav svetujejo obvezno določitev količine virusnega genoma s kvantitativno PCR pred začetkom protivirusnega zdravljenja, med zdravljenjem v dvomesečnih presledkih in nato, v primeru uspešnega odgovora na zdravljenje (negativen PCR-rezultat!) v enakih presledkih v prvi polovici leta po končanem zdravljenju in kasneje dvakrat letno. Določitev količine HCV RNA pred začetkom zdravljenja je obvezna zaradi izbire bolnikov, ki so za takšno zdravljenje najbolj primerni, ter zaradi izbire najbolj optimalne sheme zdravljenja. Tako so ugotovili, da je med bolniki s kroničnim hepatitisom C, ki imajo pred začetkom protivirusnega zdravljenja v serumu manjšo količino virusnega genoma (od 2000 do 150.000 kopij HCV RNA/ml), več takih s popolnim in dolgotrajnim odgovorom na zdravljenje, in nasprotno, da ima večina neuspešno zdravljenih bolnikov zelo visoke vrednosti serumske HCV RNA pred začetkom zdravljenja (več kot 500.000 kopij HCV RNA/ml) (8, 26, 35–38, 41). Ker je cena protivirusnega zdravljenja hepatitisa C izjemno visoka in so v večini držav denarna sredstva za ta namen omejena, je torej treba glede na omenjene ugotovitve kandidate za protivirusno zdravljenje izbirati iz skupine z nizkimi serumskimi vrednostmi HCV RNA (8, 35). Spremljanje količine HCV RNA v serumu med protivirusnim zdravljenjem je potrebno predvsem zaradi odločitve o trajanju zdravljenja (35). Ker je protivirusno zdravljenje po dosedanjih izkušnjah uspešno le pri manj kot 30 % bolnikov s kroničnim hepatitisom C, povezano s številnimi stranskimi učinki in nenazadnje zaradi visoke cene zdravil, je večina avtorjev mnenja, da je treba protivirusno zdravljenje prekiniti, če po prvih štirih mesecih zdravljenja ne pride do pomembnejšega znižanja količine virusne RNA (več kot 20 %). Ugotovili so namreč, da pride pri 90 % bolnikov s popolnim in dolgotrajnim odgovorom na protivirusno zdravljenje do pomembnega znižanja količine serumske HCV RNA (za nekaj logaritmov) ali celo do popolne odstranitve virusa najpogosteje v prvem mesecu oz. najkasneje v treh mesecih zdravljenja (35).

Spremljanje poteka in zdravljenja okužbe z virusom HIV

Aids je končna faza okužbe z virusoma človeške imunske pomanjkljivosti HIV-1 in HIV-2. Prvi uspeh boja proti aidsu je bil hiter razvoj metod za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protivirusnih protiteles. Številne izboljšave prvih seroloških testov nam danes v večini primerov omogočajo hitro in zanesljivo diagnostiko okužbe z virusoma HIV (42, 43). Določene probleme, ki jih ni mogoče dokončno razjasniti s posrednimi testi, so do nedavnega reševali predvsem s klasičnimi metodami za neposredni dokaz prisotnosti virusa, kot so določanje krožečega virusnega antigena p24, poskus osamitve virusa ali neposredna imunofluorescenca (42). Z razvojem visoko specifičnih in občutljivih metod pomnoževanja delcev nukleinskih kislin so le-te, zlasti PCR, postale metode izbora za neposredni dokaz okužbe z virusoma HIV (43). Kvalitativno različico PCR, s katero najpogosteje pomnožujemo delce provirusne DNA, vklopljene v genom bolnikovih limfocitov, danes uporabljamo predvsem:

- za dokončno opredelitev stanja okužbe s HIV pri osebah s trenutno ali stalno neopredeljivim rezultatom klasičnih potrditvenih testov (Western-blot),
- za odkrivanje zgodnje faze virusne okužbe pred pojavom specifičnega imunskega odgovora oz. serokonverzije in
- za razlikovanje prave okužbe od pasivnega prenosa anti-HIV protiteles pri novorojenčkih anti-HIV-pozitivnih mater (43, 44).

Za spremljanje poteka in opredelitev stadija okužbe z virusoma HIV ter napoved poslabšanja bolezni oz. razvoja simptomatske okužbe smo do pred kratkim največkrat uporabljali merjenje koncentracije limfocitov CD4⁺ v krvi ter več različnih neposrednih ali posrednih laboratorijskih kazalcev podvojitvene aktivnosti virusa, kot so prisotnost krožečega virusnega antigena p24, kvantitativni poskus osamitve virusa, neopterinški test ter določanje β2-mikroglobulina (9, 43). Za vse naštetih laboratorijske kazalce je bilo v času primarne okužbe z virusoma HIV značilno kratkotrajno obdobje visoko pozitivnih vrednosti, medtem ko so bili v povprečno deset let trajajočem klinično latentnem obdobju, v katerem se je število limfocitov CD4⁺ počasi, toda vztrajno zmanjševalo, skoraj vedno negativni (ali so imeli zelo nizke vrednosti). Zato je skoraj desetletje prevladovalo mnenje, da v tem klinično latentnem obdobju okužbe ni pomembnejše replikacijske aktivnosti virusa. S pojavom simptomatske okužbe in/ali padca števila limfocitov CD4⁺ pod 200/mm³ ali nekaj časa pred temi dogodki je prišlo navadno do ponovne pozitivnosti ali pomembnejšega porasta vrednosti večine naštetih laboratorijskih kazalcev (9, 43).

Z uporabo visoko občutljive kvantitativne PCR so pred kratkim nedvomno dokazali, da klinično latentna faza okužbe ni obdobje virusne nereaktivnosti, ampak, nasprotno, obdobje, v katerem se virus nenehno razmnožuje in vsakodnevno na novo okuži preseñetljivo veliko število imunokompetentnih celic, ki nato tudi hitro odmrejo (45–48). Domnevajo da se dnevno na novo okuži in odmre približno 10⁸–10⁹ celic CD4⁺ (45). Povprečna življenjska doba okužene celice je na osnovi rezultatov najnovejših raziskav ocenjena na manj kot 36 ur (9, 45). Posamezni virus se torej povprečno razmnoži 300-krat na leto oz. v desetletnem klinično latentnem obdobju bolezni nastane kar 3000 virusnih generacij. Zaradi hitre podvojitve in nastanka velikega števila generacij v kratkem času

sta po mnenju nekaterih avtorjev virusa HIV idealna modela za proučevanje teorije evolucije, saj je pri le-teh mogoče že v nekajletnem obdobju zaslediti neverjetne mehanizme prilagajanja na okolje, ki jih pri nekaterih makroorganizmih zasledimo šele po milijonih let (45, 49). Na žalost za človeka porazen rezultat te neverjetne podvojitvene sposobnosti virusov HIV je nenehno izogibanje obrambnim mehanizmom človeka, kar po nekaj letih okužbe neizogibno pripelje do smrti.

Dokaz o obstoju stalne podvojitvene aktivnosti virusov je pred kratkim tudi korenito spremenil doktrino spremljanja okuženih z virusoma HIV (9, 12). Kvantitativna PCR, s katero določamo količino HIV RNA v vzorcih plazme okuženih, je v večini držav že sprejeta kot metoda izbire ter referenčni standard za spremljanje poteka okužbe z virusoma HIV. Standardizirani diagnostični komplet Amplicor HIV Monitor®, ki temelji na kvantitativni nekompetitivni PCR, bo kot prvi pomnožitveni test nasploh skoraj zagotovo že v času tiskanja tega prispevka pridobil tudi licenco ameriške Food and Drug Administration (FDA) za diagnostično uporabo. Poglavitna prednost kvantitativne PCR v spremljanju okuženih z virusoma HIV pred drugimi starejšimi metodami je možnost natančnega in neposrednega merjenja podvojitvene aktivnosti virusov v vseh fazah okužbe (3, 6). S klasičnimi laboratorijskimi kazalci podvojitvene aktivnosti virusa smo namreč bolnike lahko spremljali le takrat ko smo vrednosti navedenih kazalcev lahko izmerili, to je na začetku okužbe, nato pa šele po razvoju ali nekaj časa pred razvojem simptomatske okužbe. Za spremljanje okuženih v klinično latentnem obdobju bolezni nam je, zaradi negativnosti ali izredno nizkih vrednosti navedenih laboratorijskih kazalcev, do nedavnega preostalo le merjenje koncentracije CD4⁺ limfocitov v krvi (9, 12). Ker so spremembe koncentracij le-teh v krvi le posredni kazalec podvojitvene aktivnosti virusa (z njo merimo le izgubo imunokompetentnih celic, ki je rezultat virusne okužbe) in ker do pomembnejših sprememb v njihovi koncentraciji pride relativno pozno (pomembnejši merljivi padec njihove koncentracije nastane povprečno šele dva meseca po pomembnejšem zvišanju podvojitvene aktivnosti virusa), večina avtorjev meni, da ta kazalec ni več zadosten za smotрно spremljanje okuženih (3, 9, 12).

V najnovejših raziskovalnih poročilih priporočajo redno določanje količine HIV RNA s kvantitativno PCR pri vseh okuženih, ne glede na stadij okužbe najmanj vsakih 6 mesecev (3, 9, 12). Z rednim spremljanjem količine HIV RNA je namreč mogoče pri skoraj vseh okuženih nekaj mesecev pred kliničnim poslabšanjem bolezni oz. razvojem simptomatske okužbe napovedati le-to ter pravočasno začeti z zaščito pred oportunističnimi okužbami ali s protivirusnim zdravljenjem (50–52). Kot pomembno napovedno spremembo količine HIV RNA, po trenutno veljavnih kriterijih štejemo že zvišanje koncentracije HIV RNA v plazmi za pol logaritma (9, 12).

Poleg pomembnejšega zvišanja koncentracije HIV RNA, je po najnovejših poročilih, drugi najpomembnejši neodvisni napovedni dejavnik hitrega poslabšanja bolezni oz. razvoja simptomatske okužbe, izhodna koncentracija HIV RNA (angl. *baseline HIV RNA load*) (9, 51). Raziskave so pokazale, da pri določeni koncentraciji limfocitov CD4⁺ osebe z višjimi izhodnimi koncentracijami HIV RNA sorazmerno hitreje razvijajo simptomatsko okužbo, in sicer v primerjavi s tistimi, ki imajo nizke koncentracije HIV RNA (51, 52). Izhodna koncentracija HIV RNA predstavlja tudi trenutno najpomembnejši napovedni

dejavnik prenosa HIV-okužbe s HIV-pozitivne matere na otroka (12, 53). Raziskave so pokazale, da je možnost takšnega prenosa HIV okužbe odvisna od višine izhodne koncentracije HIV RNA (53, 54). Tako so npr. Dickover in sodelavci nedavno ugotovili, da je med 20 HIV-pozitivnimi materami, ki so imele izhodno koncentracijo HIV RNA v plazmi višjo od 50.000 kopij/ml, pri 15 prišlo do prenosa okužbe, nasprotno pa se to ni zgodilo niti pri eni izmed 63 mater z izhodno koncentracijo HIV RNA pod 20.000 kopij/ml (54).

Podobno kot pri HCV je trenutno najpomembnejša indikacija za uporabo kvantitativnega HIV RNA PCR redno spremljanje protivirusnega zdravljenja (3, 9, 12, 49, 55). Glede na rezultate dosedanjih raziskav svetujejo obvezno določitev količine virusnega genoma s kvantitativno PCR pred začetkom protivirusnega zdravljenja v dveh neodvisnih vzorcih (izhodna koncentracija) ter po enem mesecu zdravljenja (12, 49). Določitev količine HIV RNA po enem mesecu zdravljenja je zelo pomembna, saj pride do največjega zaviranja podvojitvene aktivnosti HIV običajno po 2–3 tednih zdravljenja (12, 49). Če po enem mesecu zdravljenja ne pride do padca koncentracije HIV RNA vsaj za pol logaritma, je treba shemo zdravljenja spremeniti. Kadar je po enem mesecu zdravljenja dosežen zadovoljiv padec koncentracije HIV RNA, je treba v nadaljnjem poteku zdravljenja določati koncentracijo HIV RNA v trimesečnih presledkih ter shemo zdravljenja spremeniti takrat, ko koncentracija HIV RNA spet doseže izhodno vrednost (9, 12, 49). Redno spremljanje količine HIV RNA v času zdravljenja je po mnenju večine avtorjev tudi najboljši način boja proti razvoju sevov HIV, odpornih na protivirusna sredstva saj je mogoče na ta način ugotoviti pojav odpornosti natančneje in veliko prej kot s klasičnim spremljanjem zdravljenja s kliničnimi in imunološkimi kazalci (3).

Sklep

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani smo nedavno uvedli testa za določanje količine virusnega genoma HCV in HIV-1, ki temeljita na uporabi standardizirane kvantitativne PCR.

Za določanje količine HCV RNA potrebujemo vsaj 2 ml polne krvi (brez dodatka anti-koagulantov), ki jo je treba najkasneje v 2 urah po odvzemu dostaviti v Laboratorij za molekularno mikrobiologijo našega inštituta (Korytkova 2, zgradba nove Medicinske fakultete, 5. nadstropje, tel. 061 14 03 042, int. 398). Če krvi ni mogoče tako hitro dostaviti v laboratorij, je treba ločiti serum od krvnih celic, ga takoj shraniti na -20°C ter ga kasneje zmrznjenega dostaviti v naš laboratorij. Ta ukrep je zelo pomemben za zmanjševanje lažnonegativnih rezultatov. S tem postopkom namreč odstranimo ubikvitarne encime RNAze, ki zelo hitro in učinkovito razgrajujejo RNA in se nahajajo v krvnih celicah. Preiskava je končana v enem dnevu.

Za določanje količine HIV-1 RNA potrebujemo vsaj 2 ml polne krvi odvzete z antikoagulantom EDTA (Vacutainer® epruvetke z vijoličnim zamaškom), ki jo je treba najkasneje v 2 urah po odvzemu dostaviti v zgoraj navedeni laboratorij. Če krvi ni mogoče tako hitro dostaviti v laboratorij, je treba plazmo ločiti od krvnih celic, jo takoj shraniti pri -20°C ter jo kasneje zmrznjeno transportirati v naš laboratorij. Preiskava je končana v enem dnevu.

Literatura

1. Poljak M, Avšič-Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
2. Poljak M, Seme K, Koren S. The polymerase chain reaction: A critical review of its uses and limitations in diagnostic microbiology. *Period Biol* 1996; 98: 183–190.
3. Sninsky JJ, Kwok S. The application of quantitative polymerase chain reaction to therapeutic monitoring. *AIDS* 1993; 7: Suppl 2: 29–34.
4. Becker-Andre M, Halbrock K. Absolute mRNA quantification using polymerase chain reaction. A novel approach by a PCR aided transcript titration assay. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 9437–46.
5. Wang AW, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9717–21.
6. Mulder J, McKinney N, Christopherson C, Sninsky J, Greenfield L, Kwok S. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 292–300.
7. Kaneko S, Murakami S, Unoura M, Kobayashi K. Quantitation of hepatitis C virus RNA by competitive polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37: 278–82.
8. Garson JA. The polymerase chain reaction and hepatitis C virus diagnosis. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 14: 229–40.
9. Landesman SH, Burns D. Quantifying HIV. *JAMA* 1996; 275: 640–1.
10. Siebert PD. *Quantitative RT-PCR*. Palo Alto: Clontech, 1993: 3–31.
11. Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Technical Focus* 1993; 9: 380–5.
12. Volberding PA. HIV quantification: Clinical applications. *Lancet* 1996; 347: 71–3.
13. Zaaier HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 341: 722–4.
14. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 187–91.
15. Castillo I, Bartolome J, Quiroga JA, Carreno V. Comparison of several PCR procedures for detection of serum HCV-RNA using different regions of the HCV genome. *J Virol Methods* 1992; 38: 71–80.
16. Bockstahler LE. Overview of international PCR standardization efforts. *PCR Methods Applic* 1993; 3: 263–7.
17. Goergen B, Jakobs S, Symmons P, Hornes E, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Quantitation of HCV-replication using one step competitive RT-PCR and a solid phase, colorimetric detection method. *J Hepatol* 1994; 21: 678–82.
18. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93: 125–8.
19. Seme K, Poljak M, Avšič-Županc T. Sodobna diagnostika okužbe s virusom hepatitis C. *Med Razgl* 1994; 33: 89–103.
20. Seme K, Poljak M, Brinovec V, Lesničar G. Uporabnost seroloških testov tretje generacije v posredni diagnostiki okužbe s virusom hepatitis C. *Zdrav Vest* 1995; 64: Suppl 3: 9–12.
21. Seme K. *Virus hepatitis C pri bolnikih z velikim tveganjem okužbe*. Magistrsko delo. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1995.
22. Seme K, Poljak M. Use of commercial PCR kit for detection of hepatitis C. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1995; 14: 549–52.
23. Seme K, Poljak M, Žužek-Rešek S, Avšič-Županc T. High prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one dialysis unit in Slovenia. *Nephron* 1995; 71: 99–100.
24. Seme K, Poljak M, Lešničar G, Močivnik M. Dialysis unit without hepatitis C virus infection in Slovenia. *Nephron* 1996; 73: 322.
25. Seme K, Poljak M. Evaluation of the Amplicor HCV test: Our experiences after one year of the routine use in a diagnostic laboratory. *Infection* 1996; 14: 140–3.

26. Nakagawa H, Shimomura H, Hasui T, Tsuji H, Tsuji T. Quantitative detection of hepatitis C virus genome in liver tissue and circulation by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Di-gest Dis Sci* 1994; 39: 225–33.
27. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blod donations by »nested« polymerase chain reaction. *Lancet* 1990; 335: 1419–1422.
28. Brillanti S, Garson JA, Tuke PW, et al. The effect of interferon therapy on hepatitis C viremia in com-munity acquired chronic non-A, non-B hepatitis: A quantitative PCR study. *J Med Virol* 1991; 34: 136–41.
29. Navas S, Carreno V. Semiquantification by Amplicor assay of hepatitis C virus genome during therapy. *J Hepatol* 1995; 22: Suppl 1: 115–7.
30. Ravaggi A, Zonaro A, Mazza C, Albertini A, Cariani E. Quantification of hepatitis C virus RNA from denatured serum and hybridization on microtiter plates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 265–9.
31. Kumar U, Thomas HC, Monjardino J. Serum HCV RNA levels in chronic hepatitis C measured by quan-titative PCR assay: Correlation with serum AST. *J Virol Methods* 1994; 47: 95–102.
32. Alter HJ. To C or not to C: These are the questions. *Blood* 1995; 85: 1681–95.
33. Garson JA, Brillanti S, Ring C, Perini P, Miglioli M, Barbara L. Hepatitis C viraemia rebound after »suc-cessful« interferon therapy in patients with chronic non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1992; 37: 210–14.
34. Kakumu S, Yoshika K, Tanaka K, et al. Long-term carriage of hepatitis C virus with normal aminotrans-ferase after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1993; 41: 65–70.
35. Orito E, Mizokami M, Suzuki K, et al. Loss of serum HCV RNA at week 4 of interferon- α therapy is associated with more favorable long-term response in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1995; 46: 109–15.
36. Johnson Y, Lau N, Mizokami M. Discrepancy between biochemical and virological responses to inter-feron- α in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993; 342: 1208–9.
37. Yee HF, Wright TL. Serum ALT: Tarnished gold standard for interferon response in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994; 19: 1531–3.
38. Iino S, Hino K, Yasuda K. Current state of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Intervirology* 1994; 37: 87–100.
39. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon al-fa. A multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J Med* 1989; 321: 1501–6.
40. Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, et al. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hep-atitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1989; 321: 1506–10.
41. Chan CY, Lee SD, Hwang SJ, Lu RH, Lu CL, Lo KJ. Quantitative branched DNA assay and genoty-ping for hepatitis C virus RNA in Chinese patients with acute and chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171: 443–6.
42. Schochetman G. Diagnosis of HIV infection. *Clin Chim Acta* 1992; 211: 1–26.
43. Poljak M, Seme K, Kristančič L, Vidmar L, Tomažič J. Pomen verižne reakcije s polimerazo v diagno-stiki okužbe s HIV. *Zdrav Vestn* 1995; 64: Suppl 3: 3–7.
44. Poljak M, Seme K, Tomažič J, Vidmar L, Koren S. Clinical evaluation of Amplicor test for detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA in peripheal blood mononuclear cells. *Period Biol* 1996; 98: 205–10.
45. Coffin JM. HIV population dynamic in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and ther-apy. *Science* 1995; 267: 483–9.
46. Piatak M, Saag M, Yang LC, et al. Determination of plasma viral load in HIV-1 infection by quantita-tive competitive polymerase chain reaction. *AIDS* 1993; 7: Suppl 2: S65–S71.
47. Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, et al. The emerging genetic diversity of HIV: The importance of glo-bal surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 1996; 275: 210–6.
48. Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection de-termined by competitive PCR. *Science* 1993; 259: 1749–54.
49. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123–126.
50. Loveday C, Hill A. Prediction of progression to AIDS with serum HIV-1 RNA and CD4 count. *Lancet* 1995; 345: 790–1.

51. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122: 573–9.
52. Verhofstede C, Reniers S, van Wanseele F, Plum J. Evaluation of proviral copy number and plasma RNA level as early indicators of progression in HIV-1 infection: Correlation with virological and immunological markers of disease. *AIDS* 1994; 8: 1421–7.
53. Fang G, Burger H, Grimson R, et al. Maternal plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA level: A determinant and projected threshold for mother-to-child transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 923: 12100–4.
54. Dickover RE, Garratty EM, Herman SA, et al. Identification of levels of maternal HIV-1 RNA associated with risk of perinatal transmission. *JAMA* 1996; 275: 599–605.
55. Bruisten SM, Koppelman MHGM, Roos MTL, et al. Use of competitive polymerase chain reaction to determine HIV-1 levels in response to antiviral treatments. *AIDS* 1993; 7: Suppl 2: S15–S20.

Prispelo 16.4.1996