

Imunološke i molekularne tehnike u laboratorijskoj dijagnostici virusnih infekcija

**Nevena Arsenović-Ranin*, Marina Milenković,
Zorica Stojić-Vukanić**

Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutski fakultet,
Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija danas je integralni deo medicinske prakse. Sve veća uloga virusološke dijagnostike objašnjava se: i) epidemijom sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS), kao i napretkom u transplantaciji organa, što je dovelo do značajnog porasta broja pacijenata koji su podložni razvoju oportunističkih virusnih infekcija, ii) sve većim brojem dostupnih antivirusnih lekova, a njihova primena zavisi od laboratorijski potvrđene dijagnoze, i iii) tehnološkim napretkom i razvojem novih tehnika, kao što su produkcija monoklonskih antitela i lančana reakcija polimeraze (PCR), koje su omogućile brzu dijagnostiku virusnih infekcija. Važna karakteristika moderne dijagnostičke virusologije je korišćenje različitih metoda u detekciji virusnih infekcija. Kultura virusa, detekcija virusnih antigena i nukleinskih kiselina, kao i detekcija virusnih antitela, danas se primenjuju za dijagnozu virusnih infekcija. Mnoge molekularne tehnike za detekciju virusnih genoma primenjuju se u rutinskim dijagnostičkim laboratorijama za postavljanje dijagnoze virusnih infekcija. PCR se koristi za detekciju brojnih virusa, a sve više i za određivanje prognoze bolesti, praćenje uspešnosti primenjene terapije, procenu progresije infekcije i određivanje rezistencije virusa na anti-virusne lekove. Osetljivost i specifičnost PCR i drugih tehnika amplifikacije nukleinskih kiselina (NAATs), učinile su da ove tehnike postanu metode izbora u rutinskim dijagnostičkim laboratorijama i da potisnu ostale manje osetljive metode za detekciju virusa.

Ključne reči: dijagnostička virusologija, molekularne tehnike, serologija

*Autor za korespondenciju : nevenaar@pharmacy.bg.ac.rs

Uvod

U svakodnevnoj kliničkoj praksi dijagnoza virusnih infekcija se najčešće postavlja na osnovu kliničke slike bolesti što je nedovoljno pouzdano jer različiti virusi mogu dovesti do iste kliničke prezentacije (npr. virusi hepatitisa), a infekcije izazvane istim virusom mogu imati vrlo različite kliničke manifestacije (npr. infekcije enterovirusima). Zbog toga postavljanje specifične laboratorijske dijagnoze ima neprocenjiv značaj u odabiru optimalne antivirusne terapije (1, 2).

Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija je posebno važna u nekim oblastima kliničke medicine. Ovo se u prvom redu odnosi na imunokompromitovane pacijente, naročito na bolesnike sa transplantiranim organima ili nakon transplantacije kostne srži, HIV pozitivne pacijente; pacijente sa seksualno prenosivim bolestima, akutnim respiratornim infekcijama, gastrointestinalnim infekcijama (naročito mala deca, ali u poslednje vreme i odrasli), infekcijama sličnim mononukleozu, akutnim ili hroničnim virusnim hepatitisima, teškim infekcijama oka; i na novorođenu decu i fetuse sa kongenitalnim infekcijama. Virusološka dijagnostika takođe ima poseban značaj za javno zdravlje. Na primer, identifikacija uzročnika respiratornih infekcija je ključna za prepoznavanje novih sojeva virusa influenzae i može inicirati program masovne imunizacije u slučaju pojave epidemije (3).

Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija

Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija obuhvata uzimanje, transport i obradu kliničkih uzoraka, inokulaciju uzoraka u žive ćelijske sisteme i identifikaciju virusa. Vreme uzimanja uzorka zavisi od patogeneze virusne infekcije i kod većine virusnih infekcija (npr. influenza, morbili, parotitis i prehlade izazvane rinovirusima) eliminacija virusa započinje neposredno pre pojave simptoma i potom se rapidno smanjuje. Za hronične infekcije kao što su infekcije izazvane virusom hepatitisa B i C, virusom humane imunodeficijencije (HIV), citomegalovirusom (CMV) karakteristično je da se virus može naći u krvi pacijenta čak i kada je on u asimptomatskoj fazi infekcije. Generalno, uzorke treba uzeti u akutnoj fazi bolesti na početku pojave simptoma. Izuzetak od ovog pravila je uzimanje krvi za serološku dijagnostiku kada se uzima parni uzorak seruma, na početku bolesti i 10-14 dana kasnije.

Uzorci tkiva i brisevi koji se šalju radi kultivisanja virusa moraju se slati u transportnom medijumu za viruse (TMV) koji sprečava sušenje uzorka i onemogućava razmnožavanje bakterija i gljivica. Nasuprot tome, tečni uzorci kao što je cerebrospinalna tečnost, bronhoalveolarni lavat i urin ne razblažuju se

u TMV. Uzorci krvi se uzimaju venepunkcijom ili kroz venski kateter u sterilne epruvete sa antikoagulansom (EDTA, citrat ili heparin). Heparin se ne sme koristiti ukoliko se planiraju molekularne dijagnostičke tehnike. Svi uzorci se nakon uzimanja i tokom transporta u laboratoriju moraju držati na hladnom. Ukoliko se uzorci ne obrađuju u prvih pet dana potrebno ih je zamrznuti i to na temperaturi od -70°C (2, 3, 4, 5).

Rutinska laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija zasniva se na direktnoj i indirektnoj detekciji virusa (Tabela I). Tehnike za direktnu detekciju virusa uključuju izolovanje virusa i identifikaciju virusa u sistemima živih ćelija, dokazivanje virusnih antigena, dokazivanje virusne nukleinske kiseline i dokazivanje virusa na osnovu morfoloških osobina primenom transmisiona elektronske mikroskopije. Indirektna detekcija virusa vrši se serološkim testovima (4 - 7).

Tabela I Laboratorijske tehnike u dijagnostičkoj virusologiji

Table I Laboratory techniques in diagnostic virology

Ćelijske kulture

Elektronska mikroskopija

Detekcija virusnog antigena

Imunofluorescencija

Imunoperoksidaza

ELISA

Aglutinacija

Detekcija virusnog genoma

PCR

Druge tehnike amplifikacije nukleinskih kiselina

DNK ili RNK hibridizacija

Sekvenciranje nukleinskih kiselina

Serologija

Test neutralizacije

Test inhibicije hemaglutinacije

Test aglutinacije

Test fiksacije komplementa

ELISA

Imunofluorescencija

Western blot

Detekcija virusa

Izolacija virusa

Virusi se razmnožavaju samo u živoj ćeliji, i za njihov rast u laboratorijskim uslovima se upotrebljavaju ćelijske kulture, embrionisana jaja i eksperimentalne životinje. Za razmnožavanje virusa se koriste različite ćelijske linije pošto specifični virusi zahtevaju specifične receptore za ulazak u ćeliju i započinjanje replikacije.

Za rast ćelijskih kultura neophodni su specifični medijumi kojima se dodaju fetalni goveđi serum (kao izvor proteina i amino kiselina) i antibiotici koji treba da spreče kontaminaciju ćelijskih kultura bakterijama. Rast virusa u ćelijskoj kulturi može se dokazati na osnovu morfoloških promena u inficiranim ćelijama koje se označavaju kao citopatogeni efekat (CPE). Vreme pojavljivanja CPE zavisi od vrste, virulencije i infektivne doze virusa, a varira 1-2 dana (npr. za herpes simplex virus, HSV) 1-3 nedelje (za cytomegalovirus, CMV). (1, 5, 6).

U laboratorijama se najčešće primenjuju primarne, diploidne i kontinuirane ćelijske linije. Primarne kulture su uglavnom epitelnog porekla i dobijaju se od sveže uzetih tkiva ili organa (najčešće se koristi tkivo bubrega i fetalna tkiva). Ćelije primarnih kultura imaju iste karakteristike i broj hromozoma kao i matične ćelije. Najčešće se koriste ćelije bubrega majmuna u kojima se mogu izolovati respiratorni i enterovirusi. Diploidne kulture ćelija zadržavaju diploidan broj hromozoma, najčešće su fetalnog porekla, a po tipu ćelija su fibroblasti. Najpoznatija kultura ovog tipa je humana fibroblastna linija koja se koristi za izolaciju CMV, varicella-zoster virusa (VZV) i rinovirusa. Kontinuirane ćelijske kulture nastale su od malignih ćelija ili ćelija koje su transformisane u laboratorijskim uslovima. Imaju sposobnost neograničenog razmnožavanja i subkultivisanja. Najčešće se primenjuju HeLa (ćelije humanog karcinoma grlića materice), HEP-2 (ćelije humanog karcinoma laringsa) i Graham 293 ćelije (transformisana humana epitelnog ćelijska linija) (1, 4, 6, 8, 9).

Izolacija virusa u ćelijskoj kulturi, iako vrlo senzitivna i specifična metoda, primenjuje se samo u bolje opremljenim laboratorijama i zahteva određeno iskustvo mikrobiologa. Rezultate je ponekad neophodno očitati tek nakon nekoliko nedelja, klinički uzorci se moraju brzo i propisno transportovati do laboratorije da bi se održala infektivnost virusa. Mnogi virusi, kao što su virusi hepatitisa, papiloma virusi, parvovirus B19, rota virus i norovirus ne rastu u ćelijskoj kulturi, dok drugi, kao što su Epstein Barr virus (EBV) i HIV, zahtevaju specifične ćelije i stoga se ne izoluju u rutinskim dijagnostičkim laboratorijama (1).

Elektronska mikroskopija

Virusi su najmanji mikroorganizmi i možemo ih vizuelizovati samo elektronskom mikroskopijom (transmissionom i skening). Virusi koji imaju iste morfološke karakteristike (oblik, veličinu i simetriju) odnosno pripadaju istoj familiji ne mogu se diferencirati elektronskom mikroskopijom. Sa druge strane, elektronska mikroskopija je korisna u diferencijalnoj dijagnozi virusnih gastroenteritisa izazvanih rotavirusima, norovirusima, kalicivirusima i enteričnim adenovirusima (pripadaju različitim familijama). Međutim, za dijagnozu virusnih gastroenteritisa sve češće se primenjuju brže i senzitivnije metode (detekcija virusnih antigena i molekularne tehnike) koje su komercijalno dostupne za ove viruse.

Elektronska mikroskopija je skupa, tehnički komplikovana, zahteva obučeno osoblje i ima nisku osetljivost (potrebno je $>10^6$ virusnih čestica/ml ili gr uzorka) i s-toga je njena primena ograničena na istraživačke laboratorije (1, 5).

Detekcija virusnih antigena

Detekcija virusnih antigena vrši se primenom imunofluorescencije, imunoperoksidaznog bojenja, enzimskog imunoadsorpcionog testa (EIA ili ELISA) i testova aglutinacije. Većina metoda za detekciju virusnih antigena se primenjuje i u serološkoj dijagnostici virusnih infekcija (opisano u daljem tekstu) (10). Najčešće korišćeni test u rutinskoj laboratorijskoj praksi je imunofluorescencija i primenjuje se za detekciju respiratornih virusa (6).

Metode za detekciju virusnih antigena su posebno pogodne za viruse koji sporo rastu u ćelijskoj kulturi ili su nestabilni. Najčešće se ovim metodama identifikuju respiratorni sincicijalni virus (RSV), virusi influence i parainfluence, i adenovirusi u uzorcima iz respiratornog trakta; HSV i VZV u uzorcima iz kožnih lezija; rotavirus u uzorku stolice; i CMV i hepatitis B virus (površinski antigen) u uzorcima krvi pacijenta. Antigenski heterogeni virusi kao što su rinovirusi i enterovirusi ne mogu se detektovati ovim metodama. Metode detekcije virusnih antigena su relativno jednostavne za izvođenje i brze (rezultati su gotovi nekoliko sati nakon prijema kliničkog uzorka u laboratoriju). Testovi kojima se detektuju antigeni virusa influence (imunofluorescencija) su visoko specifični ($> 95\%$) ali imaju nisku osetljivost (6% do 80%), tako da se svaki negativan nalaz mora potvrditi alternativnim testom (5).

Detekcija virusnog genoma

Za detekciju virusnog genoma (DNK ili RNK) primenjuju se molekularne tehnike koje su značajno doprinele otkriću novih virusa, ispitivanju rezistencije virusa i dizajniranju novih antivirusnih lekova i vakcina. Ove

tehnike su osjetljive, specifične i relativno se brzo izvode. Mnoge od njih su u rutinskoj primeni u virusološkim laboratorijama i u daljem tekstu će biti detaljno opisane.

DNK ili RNK hibridizacija

Hibridizacija nukleinskih kiselina se primenjuje u virusološkoj dijagnostici u slučajevima kada u uzorku nema infektivnih viriona ili je virusni genom integrisan u ćelijski genom, kao i u slučajevima kada su virusi prisutni u imunskim kompleksima.

Nukleinske kiseline hibridizuju se sa poznatim i obeleženim fragmentima DNK (probe) koji imaju sekvencu komplementarnu specifičnim regionima virusnog genoma. DNK probe se obeležavaju enzimima, radioizotopima i hemiluminescentnim materijama.

Ova metoda se primenjuje za detekciju virusnog genoma u uzorcima fiksiranog, permeabilizovanog tkiva kada se naziva *in situ hibridizacija* ili je virusni genom prethodno prenet na čvrstu fazu (dot), najčešće nitroceluloznu membranu (*dot blot hibridizacija*). Za poslednji metod, virusni DNK genom se seče pomoću restrikcionih endonukleaza na fragmente koji se zatim razdvajaju elektroforezom u gelu, prenose na nitroceluloznu membranu i potom detektuju na membrani hibridizacijom sa DNK probom (Southern blot) (1, 2, 10). Tehnike u kojima se primenjuje DNK proba posebno su značajne za detekciju virusa koji se sporo replikuju ili virusa koji se ne mogu umnožiti u ćelijskim kulturama kao što su CMV i humani papiloma virusi.

Kod RNK virusa elektroforetski se razdvajaju fragmenti RNK (Northern blot) i nakon transfera na membranu hibridizuju sa komplementarnom DNK (cDNK) ili RNK (1, 10).

Da bi se dobila pozitivna reakcija neophodan je veliki broj kopija virusne DNK ili RNK zbog čega je ova tehnika nedovoljno osjetljiva i sve više se zamenjuje tehnikama amplifikacije nukleinskih kiselina (engl. *nucleic acid amplification techniques, NAATs*).

Tehnike amplifikacije nukleinskih kiselina (engl. *nucleic acid amplification techniques, NAATs*)

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction, PCR*)

Lančana reakcija polimeraze je prototip tehnika amplifikacije nukleinskih kiselina. Ovu molekularno biološku tehniku otkrio je Kary Mullis 1985. godine. Zasniva se na izolovanju i eksponencijalnom umnožavanju željenog segmenta DNK putem enzimske replikacije. Umnožavanje DNK putem PCR-a

se bazira na hibridizaciji specifičnih oligonukleotida (prajmera) i *in vitro* sintezi kopija željenog fragmenta koji je oivičen i obeležen datim prajmerima.

Za izvođenje PCR-a neophodni su:

1. DNK lanac koji se želi umnožiti i služi kao obrazac za kopiranje komplementarnog lanca (označava se kao DNK matrica ili ciljna DNK sekvenca);
2. jednolančani prajmeri - oligonukleotidi koji obeležavaju početak i kraj onog dela lanca koji se želi umnožiti;
3. enzim DNK polimeraza koja vrši sintezu novih DNK lanaca;
4. smeša slobodnih dezoksinukleotidnih trifosfata (dNTP) iz kojih DNK polimeraza gradi novu DNK;
5. odgovarajući pufer sa obaveznim sadržajem Mg^{2+} jona.

U PCR metodi se koristi termostabilna DNK polimeraza izolovana iz bakterije *Thermus aquaticus* (nazvana Tag polimeraza) koja živi u termalnim izvorima na temperaturi oko $70^{\circ}C$.

PCR reakcija se sastoji od serije ponavljajućih ciklusa (20-30).

Svaki ciklus se sastoji iz tri osnovne faze :

1. Denaturacija dvostrukog lanca DNK (raskidanje vodoničnih veza), pri čemu se dobijaju dva jednostruka lanca, od kojih je svaki matrica za naredni korak reakcije;
2. Hibridizacija, tj. proces vezivanja prajmera za odgovarajući komplementarni deo jednolančane matrice uspostavljanjem vodoničnih veza je najosetljiviji deo reakcije od koga praktično počinje formiranje prva dva lanca „nove” sekvence DNK;
3. DNK sinteza tj. ekstenzija (elongacija) prajmera na 3'OH kraju sledstvenim dodavanjem dezoksinukleotida redosledom koji je određen sekvencom matrice, uz angažovanje DNK polimeraze.

Odgovarajućim brojem ponavljanja ciklusa dobija se količina tražene sekvence DNK koja je dovoljna za dalju analizu.

Neophodan uslov za izvođenje opisanih koraka ciklusa jeste postizanje odgovarajuće temperature za svaki segment ciklusa, i to u tačno utvrđenom vremenu. Tako, inicijalna denaturacija (pre prvog ciklusa) traje uglavnom 3-5 minuta na temperaturi od $96^{\circ}C$, dok svi kasniji koraci denaturacije mogu trajati 20-60 sekundi na temperaturi $94-96^{\circ}C$. Hibridizacija se odvija na temperaturi $40-60^{\circ}C$ i obično traje 20-40 sekundi. Elongacija se vrši na $72^{\circ}C$, a trajanje ove faze zavisi od dužine fragmenta koji se želi umnožiti i iznosi 1-2 minuta.

Broj ovakvih ciklusa je 25 do 40 i odvija se u posebno dizajniranim i kalibrisanim aparatima (Termocycler) koji omogućavaju tok reakcije. U 40

takvih ciklusa može se sintetisati više od milion kopija genoma što traje samo 2-3 sata.

Nakon izvođenja opisanog procesa neophodno je izvršiti identifikaciju PCR amplifikovanog fragmenta što se najčešće izvodi elektroforezom na agaroznom gelu i bojenjem etidijum bromidom (EtBr). Pri pravljenju agaroznog gela, dodaje se EtBr koji ima sposobnost fluorescencije pod UV svetlošću. Kada nanese uzorke na ovako pripremljen gel molekuli EtBr se inkorporiraju u dvolančanu DNK tako da se pod UV svetlošću produkti PCR reakcije vide u obliku traka. Istovremeno se na gel nanosi i standard koji služi za identifikaciju PCR produkata (11, 12).

Danas se primenjuju mnoge varijante PCR tehnike:

- **Nested PCR:** prajmeri koji se koriste u prvom ciklusu amplifikacije se ili oba zamenjuju (nested PCR), ili se samo jedan prajmer zamenjuje (semi-nested PCR), u drugom i svim narednim ciklusima amplifikacije. Na taj način se smanjuje nespecifična amplifikacija DNK čime se povećava specifičnost PCR tehnike. Nested PCR je posebno pogodan za amplifikaciju dugih fragmenata DNK i daje bolje rezultate nego standardni PCR (1, 2, 13).
- **Multiplex PCR** uključuje istovremeno dodavanje setova različitih prajmera u jednu reakcionu smešu pri čemu nastaju DNK fragmenti različite veličine koji su specifični za različite DNK. Temperatura na kojoj se odvija proces hibridizacije prajmera mora biti optimalna za svaki set prajmera, a veličina novosintetisanih fragmenata DNK se mora značajno razlikovati da bi se mogli vizuelizovati kao odvojene trake pomoću elektroforeze (1, 2, 5, 13). Multipleks esejima je moguće istovremeno detektovati genome različitih virusa (npr. respiratornih virusa: virusa influence A i B, RSV tipa A i B, virusa parainfluence tip 1, 2 i 3; enterovirusa; herpes simplex tip 1 i 2 i varicella zoster virusa u cerebrospinalnoj tečnosti) ili čak više genoma različitih patogena (npr. DNK Epstein Barr virusa i DNK protozoe *Toxoplasma gondii*, koji dovode do masivnih lezija u mozgu pacijenata sa AIDS-om). (14, 15). Komercijalni multiplex eseji za detekciju respiratornih virusa imaju visoku osetljivost (91% do 100%) i specifičnost (97.4% do 100%) u poređenju sa konvencionalnom kulturom virusa i testom indirektno imunofluorescencije (5).
- **Kvantitativni PCR** daje podatak o količini DNK ili RNK koja je prisutna u uzorku. Određivanje se zasniva na dodavanju poznate

količine alternativne sekvence nukleotida (kompetitor) koja se amplifikuje istim prajmerom kao i ciljna sekvenca. Kompetitor se mora razlikovati od ciljne sekvence na osnovu veličine ili delimično u redosledu nukleotida, što omogućava diferenciranje umnoženog kompetitora od umnožene ciljne sekvence. Posle amplifikacije količina ciljne sekvence u originalnom uzorku određuje se iz odnosa umnožene ciljne sekvence i umnoženog kompetitora (1-3).

- **Real-time PCR** je metoda za detekciju i kvantifikaciju amplifikovanog PCR produkta koja se bazira na korišćenju fluorescentnih boja koje se vezuju za DNK, kao što su SYBR Green i Eva Green ili DNK proba koje sadrže fluorofore, kao što je TaqMan proba. Signal fluorescencije je direktno proporcionalan količini nastalog PCR produkta i prati se u svakom ciklusu, „in real time”, tako da vreme kada se registruje prvi značajni porast u količini PCR produkta korelira sa početnom količinom ciljne DNK sekvence.

Metoda se izvodi u visoko specijalizovanim automatizovanim instrumentima koji uključuju optičke sisteme za ekscitaciju fluorescentnih boja i detekciju emisije fluorescencije. U odnosu na konvencionalni PCR, real-time PCR ima nekoliko prednosti. Vreme izvođenja testa je značajno kraće (na primer, PCR reakcija u Light Cycler aparatu, Roche Diagnostics, traje samo 30 minuta) jer se detekcija umnoženog PCR produkta vrši u istoj reakcionoj smeši u kojoj se vrši i umnožavanje DNK tako da nije potreban odvojen korak detekcije amplifikovanih DNK produkata (npr. gel elektroforezom). Pored toga, smanjena je mogućnost kontaminacije jer se reakcija odvija u zatvorenom sistemu.

Ovom metodom se može odrediti količina virusa (engl. viral load) u krvi pacijenta (npr. HIV, hepatitis C virus) (1, 3, 6, 10).

- **Reverzna transkriptaza PCR (engl. reverse transcription PCR, RT-PCR)** se primenjuje u slučaju kada je ciljna sekvenca virusna RNK koja mora prvo da bude prepisana u komplementarnu DNK pomoću enzima reverzne transkriptaze. RT-PCR se primenjuje za detekciju brojnih RNK virusa kao što su HIV, hepatitis C virus, respiratorni virusi (RSV, influenza i parainfluenca virusi), virusi koji izazivaju gastroenteritise (enterovirusi, rotavirusi i drugi). RT-PCR se takođe primenjuje za detekciju virusne informacione RNK (iRNK) što je posebno značajno u dijagnostici infekcija izazvanih virusima koji u svom životnom ciklusu imaju fazu latencije. Za ove viruse detekcijom virusne DNK nije moguće razdvojiti latentnu i

produktivnu infekciju, dok detekcija iRNK ukazuje na produktivnu fazu infekcije. Pored RT-PCR za detekciju virusne RNK najpogodniji je test amplifikacije bazirane na transkripciji (opisan u daljem tekstu) (3,10).

Pored PCR metode razvijene su i mnoge druge NAAT koje se mogu klasifikovati u dve grupe, kao eseji u kojima se amplifikacija vrši na nivou transkripcije ciljne sekvence ili na nivou signala za detekciju (6). Primer prve grupe eseja je **amplifikacija koja se zasniva na transkripciji** (engl. **transcription – based amplification**). U ovom testu se koriste dva prajmera i dva enzima, RNK polimeraza i reverzna transkriptaza. U prvom koraku amplifikacije prajmer se vezuje za T7 promotor ciljne RNK, a potom reverzna transkriptaza (RT) sintetiše prvi komplementarni DNK lanac (cDNK) i formira se dvolančani hibrid RNK/DNK. Enzim RNK-aza H (RT) razgrađuje RNK lanac iz hibridnog molekula, a zatim se drugi prajmer vezuje za cDNK lanac koji će poslužiti kao matrica sa koje reverzna transkriptaza prepisuje drugi DNK lanac tako da se formira dvolančana DNK matrica. Enzim RNK polimeraza prepoznaje promotor sekvencu na dvolančanom molekulu DNK i započinje transkripciju RNK. Svaki novosintetisani lanac RNK ponovo ulazi u ciklus što dovodi do eksponencijalnog umnožavanja ciljne RNK sekvence, tako da od jedne ciljne sekvence, u toku samo jednog sata, nastaje bilion novih molekula RNK. Reakcija je autokatalitička i izotermalna, tako da se može izvoditi u vodenom kupatilu i ne zahteva skupu opremu (2, 3, 10, 15,16).

U grupi eseja koji se zasnivaju na amplifikaciji signala, ne vrši se amplifikacija ciljne sekvence, već hemijskog signala koji se koristi za detekciju hibridizacije probe sa nukleinskom kiselinom. U **testu sa razgranatim lancem DNK** (engl. **branched chain of DNA assay, bDNA assay**), sekvenca komplementarna relevantnoj virusnoj DNK ili RNK sekvenci je imobilisana za čvrstu fazu. Vezivanje nukleinske kiseline patogena prisutnog u uzorku za fiksirane DNK oligomere detektuje se dodatkom specifične probe kuplovane za izrazito razgranati lanac DNK (engl. branched chain of DNA, bDNA) koji sadrži mnogo tzv. „lepljivih krajeva”. Zatim se dodaje enzimom-obeležena DNK proba koja je komplementarna „lepljivim krajevima”. Nakon dodatka odgovarajućeg supstrata nastaje signal koji se može kvantifikovati na sličan način kao u ELISA testu. Jačina signala u bDNA testu je proporcionalna broju enzimom-obeležениh proba koje hibridizuju sa sekundarnim bDNA sekvencama. Testovi koji se baziraju na bDNK tehnologiji rutinski se koriste u kvantifikaciji virusa (HIV-1, HCB i HCV virusa, cytomegalovirusa, humanog papiloma virusa), ali i nekih parazita (*Trypanosoma brucei*) i bakterija (*Staphylococcus aureus*) (2, 3, 10, 17,18).

Sekvenciranje virusnih nukleinskih kiselina

Sekvenciranje delova genoma virusa se obično vrši neposredno posle amplifikacije PCR produkta i koristi se u medicinskoj virusologiji u cilju: 1. utvrđivanja filogenetskih odnosa između virusnih izolata radi epidemiološkog otkrivanja i praćenja izvora, rezervoara, puteva i načina širenja virusnih infekcija; 2. genotipizacije virusa tj. određivanja korelacije između genetskih tipova s jedne strane i fenotipova virusa s druge strane, što je od značaja za imunoprofilaksu, terapiju i prognozu virusnih oboljenja; 3. funkcionalne karakterizacije određenih virusnih sekvenci što je od posebnog interesa u izučavanju patogeneze virusnih infekcija i sinteze antivirusnih lekova. (19). Glavna primena ove metode u dijagnostičkoj virusologiji odnosi se na ispitivanje rezistencije na antivirusne lekove koji se primenjuju u terapiji HIV infekcije. Detekcija mutacija koje su odgovorne za pojavu rezistencije vrši se direktno iz plazme pacijenta. Danas su dostupni komercijalni testovi za detekciju mutacija odgovornih za rezistenciju CMV, VZV, HSV, HCV i HBV na anti-virusne lekove (13). Osnovni nedostatak genotipskih eseja je da se njima može detektovati samo rezistencija uzrokovana poznatim mutacijama (2, 5).

Serološke tehnike

Serološka dijagnostika virusnih infekcija zasniva se na dokazivanju virus-specifičnih antitela u serumu inficirane osobe. Serološki testovi se najčešće primenjuju u dijagnostici akutnih infekcija ili za utvrđivanje imunskog statusa osobe prema određenom virusu. Serološka dijagnostika je značajna za viruse koji se teško kultiviraju ili je metoda izolacije dugotrajna i komplikovana.

Serološka dijagnostika se bazira na praćenju titra specifičnih antitela koja se javljaju u odgovoru na virusnu infekciju. Prva antitela koja se pojavljuju u serumu inficirane osobe su IgM klase i mogu se detektovati već nekoliko dana od početka infekcije. Neki od klonova aktiviranih B limfocita potom počinju da produkuju IgG antitela koja se pojavljuju u serumu 7-15 dana posle početka infekcije. Količina obe klase antitela se povećava u odgovoru na infekciju i dostiže maksimalni nivo oko 6. nedelje od početka infekcije. Virus specifična IgM antitela nakon toga počinju da opadaju i ne mogu se detektovati posle 3 meseca. Za razliku od njih IgG antitela perzistiraju čitavog života i odgovorna su za doživotni imunitet prema određenom virusu. Shodno navedenom, akutna virusna infekcija se dijagnostikuje na osnovu:

- prisustva virus specifičnih IgM antitela (IgG može, ali ne mora biti prisutan);
- porasta titra antitela u parnim uzorcima seruma u periodu između akutne faze bolesti i faze oporavka, ili

- visokog titra antitela u rekonvalescentnoj fazi bolesti.

Preležana infekcija, odnosno specifičan imunitet, dijagnostikuje se na osnovu detekcije samo virus-specifičnih IgG antitela.

Serološka dijagnostika kod pacijenata sa reinfekcijom ili reaktivacijom stare infekcije je komplikovanija u odnosu na dijagnozu inicijalne infekcije. U oba slučaja infekcija se javlja kod osoba koje već imaju pozitivan nalaz specifičnih IgG antitela, s tim što u reinfekciji dolazi do porasta samo titra specifičnih IgG antitela u odsustvu IgM antitela, dok u toku reaktivacije latentne infekcije, kao u slučaju herpesvirusa, dolazi do porasta nivoa specifičnih IgM i IgG antitela. U hroničnim virusnim infekcijama, kao što su infekcije izazvane HIV i HTLV I i HTLV II, i hepatitis C virusom (HCV) pozitivan nalaz antitela, bez obzira na njihovu klasu, uvek ukazuje na aktivnu virusnu infekciju (1- 3).

Principi seroloških tehnika

Serološki testovi koji se primenjuju u virusološkoj dijagnostici mogu biti kvalitativni i kvantitativni. Po pravilu, testovi u kojima se dijagnoza postavlja na osnovu prisustva IgM ili IgG su obično kvalitativni, pošto je prisustvo ili odsustvo ovih antitela dovoljno za postavljanje dijagnoze. S druge strane, ako se dijagnoza zasniva na detekciji rastućeg ili visokog titra antitela, onda test treba da izmeri nivo antitela (kvantitativni test). „Titar” antitela predstavlja recipročnu vrednost najvećeg razblaženja seruma u kojem su detektovana antitela.

Sve serološke tehnike u kojima se detektuje antitelo zasnivaju se na principu dodavanja virusnog / virusnih antigena u serum pacijenta. Ukoliko su virus-specifična antitela prisutna u serumu, vezaće se za antigen i formirati antigen-antitelo kompleks. Potom se, u zavisnosti od tehnike, dodaju različiti indikatorski sistemi koji treba da detektuju da li se takav kompleks formirao. Većina ovih tehnika se koristi i za detekciju prisustva virusnog antigena u serumu pacijenta (npr. površinski antigen hepatitis B virusa - HbsAg).

Serološke reakcije se mogu podeliti u četiri grupe:

- testovi koji detektuju antitela koja blokiraju biološke aktivnosti virusa (test neutralizacije i test inhibicije hemaglutinacije)
- testovi koji se zasnivaju na biološkim funkcijama antitela u kompleksu sa antigenom (aglutinacija, test fiksacije komplementa)
- testovi koji se zasnivaju na primeni obeleženih antitela (ELISA, imunofluorescencija)
- testovi pomoću kojih se određuje serološki profil antitela na pojedinačne virusne antigene (Western blot) (1-3, 12, 20).

Dijagnostička primena seroloških testova prikazana je u Tabeli II.

Tabela II Dijagnostička primena seroloških tehnika
Table II Diagnostic uses of the serological techniques

Test	Primena testa (primeri)
Fiksacija komplementa	Detekcija antitela specifičnih za respiratorne viruse
ELISA	IgG/IgM antitela - rubela, morbili, mumps, HIV, hepatitis A Antigeni - HBs u serumu, norovirusa i rotavirusa u fecesu
Imunofluorescencija	IgG/IgM antitela - EBV, VZV Antigen – RSV, influenza i drugi respiratorni virusi u respiratornim sekretima
Aglutinacija	Antitela - rubela, toksoplazma Antigen - rotavirus, norovirus
Western blot i rekombinantni imunovezujući eseji	Potvrdni za HIV i HCV

Test neutralizacije

Virus-specifična antitela, ukoliko su prisutna u serumu, neutrališu virus, tako da on ne može da raste u kulturi. Ovo je veoma specifična, ali komplikovana, skupa i tehnički zahtevna metoda, i uglavnom je zamenjena savremenijim tehnikama.

Test inhibicije hemaglutinacije

Ovim testom detektuju se antitela specifična za viruse (rubela, influenza) koji poseduju hemaglutinin antigen. Test je relativno neosetljiv i može dati nespecifičnu reakciju. Uglavnom je zamenjen senzitivnijim i specifičnijim tehnikama.

Test aglutinacije

U ovim testovima, antigen ili antitelo se adsorbuje na inertne čestice (lateks ili želatin), i pozitivna reakcija se vidi kao aglutinacija čestica.

Prednost testova aglutinacije je jednostavnost; brzi su, i ne zahtevaju sofisticiranu opremu.

Test fiksacije komplementa

Test se zasniva na činjenici da kompleks antitelo-antigen vezuje („fiksira”) komplement, tako da slobodan komplement nije dostupan da lizira senzibilisane eritrocite koji se dodaju kao indikator reakcije.

Test fiksacije komplementa se ranije mnogo koristio u kliničkoj dijagnostici. Međutim, zbog svoje kompleksnosti i relativne neosetljivosti, danas je uglavnom svuda zamenjen ELISA testom.

ELISA (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA testovi su najčešće korišćeni serološki testovi u rutinskim dijagnostičkim laboratorijama. Postoji nekoliko modifikacija ove tehnike, ali u svima se virusni antigen imobilizuje na čvrstu fazu, kao što je zid bazenčića plastične mikrotitracione ploče ili plastične čestice. Potom se u bazenčić dodaje serum pacijenta. Ako je u serumu prisutno specifično antitelo, ono će se vezati za antigen na čvrstoj fazi. Višak seruma se uklanja, a bazenčić ispira nekoliko puta. Sledeći korak podrazumeva dodavanje antitela protiv humanih imunoglobulina obeleženih enzimom. Višak odnosno nevezana anti -humana antitela se uklanjaju ispiranjem, a zatim se dodaje odgovarajući supstrat za enzim pri čemu se razvija boja čiji se intenzitet meri kolorimetrijski i direktno je proporcionalan koncentraciji specifičnih antivirusnih antitela u uzorku. Prednost ove metode je mogućnost detekcije IgM ili IgG anti-virusnih antitela korišćenjem izotip-specifičnih anti-humanih imunoglobulina.

ELISA testovi koji se danas primenjuju imaju veliku osetljivost i specifičnost (> 95%), neki čak blizu 100%.

ELISA testom takođe se mogu detektovati virusni antigeni ukoliko se za čvrstu fazu veže antitelo (monoklonsko ili poliklonsko) specifično za antigen koji se testira.

Prednosti ELISA tehnika su:

- brzina izvođenja (većina testova traje 2-3h);
- automatizovane su;
- objektivne su jer se reakcija očitava spektrofotometrijski.

Imunofluorescencija (direktna ili indirektna)

Ovi testovi se zasnivaju na istim principima kao i ELISA i takođe mogu detektovati anti-virusna antitela ili virusni antigen u uzorku. Umesto enzimsupstrat detektorskog sistema, u ovim testovima, za detekciju kompleksa antigen-antitelo koristi se antitelo obeleženo fluorescentnom bojom (najčešće fluorescein izotiocijanatom-FITC).

Imunofluorescentni testovi su takođe brzi, ali je njihov osnovni nedostatak subjektivnost u tumačenju rezultata, jer u velikoj meri zavise od iskustva osobe koja interpretira test. Najčešće se primenjuju za brzu dijagnostiku respiratornih virusa (influenca, parainfluenca i RSV).

Western blot

Western blot i srodni rekombinantni imunovezujući eseji omogućavaju određivanje serološkog profila, odnosno detekciju antitela na pojedinačne virusne antigene. U Western blotu, virusni antigeni prisutni u inficiranoj ćeliji su denaturisani, razdvojeni gel elektroforezom i preneti na membranu. Potom se membrana inkubira sa ispitivanim serumom i vezivanje anti-virusnih antitela iz seruma se detektuje dodavanjem anti-humanih imunoglobulina obeleženih enzimom. Reakcija se vizuelizuje dodavanjem supstrata za enzim pri čemu nastaju obojene trake. Western blot je visoko specifična tehnika jer omogućava detekciju antitela specifičnih za različite virusne proteine. Otuda, njegova glavna primena u dijagnostičkim laboratorijama je potvrda nalaza skrining eseja kao što je ELISA koji je manje specifičan. Na primer, Western blot služi kao konfirmativni test za HIV infekciju nakon pozitivnog nalaza HIV-specifičnih antitela ELISA testom. Western blot se takođe smatra zlatnim standardom za određivanje tipske specifičnosti antitela protiv herpes simpleks virusa. Rekombinantni imunovezujući eseji se razlikuju od Western blota po tome što se specifični virusni antigeni produkuju rekombinantnom tehnikom ili sintezom peptida i vežu za membranu u određenoj konfiguraciji (često kao dotovi ili trake). Membrane se tada inkubiraju sa serumom i vezana antitela se detektuju kao i u Western blotu. Za razliku od Western blota, antigeni koji se koriste u ovim testovima nisu denaturisani, pa ovi testovi imaju prednost kada treba detektovati antitela na konformacione epitope. Rekombinantni imunovezujući esej ima široku primenu kao potvrdni esej za hepatitis C i HIV pozitivni nalaz dobijen ELISA testom (2, 5).

Zaključak

Uprkos razvoju i dostupnosti savremenih molekularnih tehnika u dijagnostičkoj virusologiji, serologija će i u budućnosti imati značajno mesto u laboratorijskoj dijagnozi akutnih i hroničnih virusnih infekcija. Pored toga,

serologija je važna u procenjivanju imunskog statusa pacijenta bilo da se radi o stanju nakon prirodne infekcije ili vakcinacije. Serološki testovi su od neprocenjivog značaja za epidemiološke studije koje daju podatke o prevalenci infektivnih bolesti.

Molekularne tehnike su postale deo rutinske virusološke dijagnostike. Kao i serološke metode NAAT tehnike su danas automatizovane i moguće je uraditi kompletan test (ekstrakciju, amplifikaciju i detekciju) korišćenjem u potpunosti automatizovane opreme, čime su ovi testovi postali lakši za izvođenje, a mogućnost kontaminacije je svedena na minimum. Real-time PCR omogućava dobijanje rezultata za nekoliko sati, a multiplex PCR omogućava detekciju nekoliko virusa istovremeno u jednom testu. Osetljivost i specifičnost NAAT tehnika, zajedno sa gore navedenim prednostima, učinile su da ove tehnike postanu metode izbora u rutinskim dijagnostičkim laboratorijama i da potisnu ostale manje osetljive metode za detekciju virusa.

Literatura

1. Kudesia G, Wreghitt. *Clinical and Diagnostic Virology*. Cambridge University Press, 2009.
2. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
3. Storch GA. *Diagnostic Virology*. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 493-531.
4. Krstić Lj, *Medicinska virusologija*, drugo izdanje, 2000.
5. Murray PR, Witebsky FG. *The Clinician and the Microbiology Laboratory*. In: Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, eds. Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin. 7th ed., Churchill Livingstone Elsevier, 2010: 233-65.
6. Storch GA. *Diagnostic virology*. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 739-51.
7. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007; 40(2): 93 - 8.
8. Nester EW, Anderson DG, Roberts CE, Nester MT. *Microbiology a human perspective*. 5th ed. McGraw-Hill Companies, New York 2007.
9. Black JG. *Microbiology*. 7th ed. John Wiley & Sons, INC 2008.

10. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 5th ed. Elsevier Mosby, 2005.
11. Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ* 2004; 28: 44-50.
12. Arsenović Ranin N, Stojić Vukanić Z, Bufan B. Priručnik za praktičnu nastavu iz imunologije i imunohemije, Farmaceutski fakultet u Beogradu 2007.
13. Forman MS, Valsamakis A. Specimen Collection, Transport, and Processing : Virology. In : Murray PR, Baron E, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM PRESS Washington D.C., 2003: 1227-41.
14. Roberts TC, Storch GA. Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 268–9.
15. Stary A, Schuh E, Kerschbaumer M, Götz B, Lee H. Performance of Transcription-Mediated Amplification and Ligase Chain Reaction Assays for Detection of Chlamydial Infection in Urogenital Samples Obtained by Invasive and Noninvasive Methods. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(9): 2666–70.
16. Pommerville JC. Alamo's Fundamentals of Microbiology. 7th ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury Massachusetts, 2004.
17. Tsongalis GJ. Branched DNA technology in molecular diagnostics. *Am J Clin Pathol.* 2006; 126(3): 448-53.
18. Thomas SA. Serology or Molecular Infectious Disease Testing - Which, When, and Why? *Infectious Diseases in Clinical Practice.* 2006; 14: 373-6.
19. Stankov S. Razvoj i značaj komparativne sekvencijske analize u medicinskoj virusologiji. *Med Pregl* 2006; LIX (3-4): 138-42.
20. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology, an introduction. 8th ed. San Francisco CA, 2004.

Immunological and molecular techniques in laboratory diagnosis of viral infections

**Nevena Arsenović-Ranin *, Marina Milenković,
Zorica Stojić-Vukanić**

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy,
University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

Diagnostic virology is presently integrated into routine medical practice. The expanded role of diagnostic virology has several explanations. First, the human immunodeficiency virus (HIV) and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) epidemic and the success of organ transplantation have greatly increased the pool of patients at risk for serious opportunistic viral infections. Second, an increasing number of antiviral agents are available, and their use often depends on establishing a laboratory-based diagnosis. Third, technologic developments such as monoclonal antibodies and the polymerase chain reaction (PCR) have made rapid viral diagnosis a reality. An important characteristic of modern diagnostic virology is the use of multiple methods for detecting viral infections. Viral culture, detection of viral antigens and nucleic acids, and detection of viral antibodies are all used to diagnose current viral infection. Many of molecular techniques for detecting of viral genomes are in use in routine diagnostic laboratory to aid viral diagnosis. PCR has been used to detect numerous viruses and is increasingly used to assess prognosis, monitor response to treatment, assess progression of infection, and assess of viral resistance to antiviral drugs. The sensitivity and specificity of PCR and other Nucleic Acid Amplification Techniques (NAATs) have made NAATs the diagnostic assay of choice in routine diagnostic laboratories to replace other less sensitive methods of viral detection.

Key words: diagnostic virology, molecular techniques, serology

*corresponding author : nevenaar@pharmacy.bg.ac.rs