

Usporedba kvantifikacije DNA virusa Epstein-Barr primjenom dvaju testova lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Listeš, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:180479>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Listeš

**Usporedba kvantifikacije DNA virusa
Epstein-Barr primjenom dvaju testova
lančane reakcije polimerazom u stvarnom
vremenu**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je izrađen na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti “dr. Fran Mihaljević”, pod mentorstvom naslovne izv. prof. dr. sc. Snježane Židovec Lepej. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Od srca zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Snježani Židovec Lepej na vodstvu, ljubaznosti i pomoći, kao i na sveukupno iznimno ugodnoj suradnji kroz cijeli postupak izrade diplomskoga rada.

Zahvaljujem i dr.sc. Leoni Radmanić Matotek na trudu i pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela ovoga rada.

Želim zahvaliti i mag.mol.biol. Kristianu Boduliću na velikoj pomoći kod obrade podataka dobivenih u ovome istraživanju.

Veliko hvala svim mojim prijateljima na druženju, zabavi, ali i neizmjerne podršci, te jer su mi uljepšali studentski period života.

Najveću zahvalu imam za svoju obitelj, posebno mamu Tatjanu i sestru Fani koje su mi kroz cijeli život iskazivale neizmjernu ljubav i podršku bez kojih sva moja dosadašnja, ali i buduća postignuća ne bi bila moguća.

Posebno hvala imam za voljene osobe koje više nisu s nama, ali su imale neizostavnu ulogu u mom životu i za koje znam da bi bile neizmjerno ponosne na obrani ovoga diplomskoga rada

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Usporedba kvantifikacije DNA virusa Epstein-Barr primjenom dvaju testova lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Ivana Listeš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus Epstein-Barr (EBV) onkogeni je virus koji pripada porodici *Orthoherpesviridae* i rodu *Lymphocryptovirus* čiji se genom sastoji od dvolančane molekule DNA koja sadrži oko 172 kb. Virus EBV umnožava se u epitelnim stanicama, B-limfocitima, T-limfocitima i NK-stanicama, a opisana su dva glavna tipa replikacijskog ciklusa EBV-a; latentni i litički ciklus. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti broj kopija DNA EBV-a u uzorcima periferne krvi određenih primjenom dvaju standardiziranih kvantitativnih PCR testova u stvarnom vremenu te utvrditi jesu li rezultati procjene kinetike virusne replikacije usporedivi i primjenjivi u biološkim i biomedicinskim istraživanjima. Rezultati detekcije DNA EBV-a u 100 uzoraka periferne krvi qPCR testovima u stvarnom vremenu *LightMix LightCycler 2.0* i *LightMix LightCycler 480 II* s adaptiranim protokolom bili su podudarni u 99 od 100 uzoraka (Kohenov kappa koeficijent 0,98 uz 95% interval pouzdanosti 0,94-1,00). Rezultati usporedbe kvantifikacije DNA EBV-a pokazali su statistički značajnu razliku u viremijama (medijan 49 400 vs. 128 000 kopija DNA EBV-a, $p < 0.001$). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se praćenje kinetike replikacije virusa EBV u biomedicinskim istraživanjima obvezno mora temeljiti na primjeni identičnog standardiziranog molekularnog testa u potpunom istraživanju te da rezultati između dostupnih standardiziranih testova nisu u potpunosti usporedivi.

Ključne riječi: EBV, viremija, real-time PCR
(36 stranica, 12 slika, 4 tablice, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: naslovna izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej

Ocjenitelji:

naslovna izv. prof. dr. sc. Snježana Židovec Lepej
Prof.dr.sc. Petra Korać
Prof.dr.sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 08.02.2024

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Comparison of Epstein-Barr virus DNA quantification using two real-time polymerase chain reaction assays

Ivana Listeš

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Epstein-Barr virus (EBV) is an oncogenic virus that belongs to the family *Orthoherpesviridae*, genus *Lymphocryptovirus*, and has a double-stranded DNA genome that consists of 172 kb. The main cellular targets for viral replication via latent and lytic cycles include epithelial cells, B-lymphocytes, T-lymphocytes and NK-cells. The aim of this study was to compare the number of EBV DNA copies in peripheral blood samples determined by using two standardized real-time quantitative PCR test and to determine whether the results of the viral replication kinetics assessment are comparable and applicable in biological and biomedical research. EBV DNA detection in 100 peripheral blood samples by using 2 real-time PCR assays (*LightMix LightCycler 2.0* and *LightMix LightCycler 480 II* with adapted protocol) showed concordant results in 99 of 100 samples (Kohen's kappa coefficient 0,98, 95% confidence interval 0,94-1,00). Comparison of EBV DNA quantification results obtained by the two assays has shown a statistically significant difference in measured viremias (median 49 400 vs. 128 000 EBV DNA copies/ml, $p < 0.001$). The results of this study have shown that monitoring of EBV quantification in biomedical research needs to be based on consistent use of identical molecular assays and that the results of standardised assays available today are not completely comparable.

Keywords: EBV, viremia, real-time PCR

(36 pages, 12 figures, 4 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Snježana Židovec Lepej, PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Snježana Židovec Lepej, PhD

Prof. Petra Korać, PhD

Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: 08.02.2024

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Virus Epstein-Barr	1
1.1.1 Otkriće virusa EBV	1
1.1.2 Struktura i tropizam virusa EBV	2
1.2 Ustrojstvo genoma	4
1.3 Replikacijski ciklus.....	6
1.3.1 Latentni ciklus	7
1.3.2 Litički ciklus.....	7
1.4 Imunosni odgovor na infekciju virusom EBV.....	8
1.5 Virus EBV te povezanost s malignim i autoimunim bolestima.....	10
1.6 Izazovi u razvoju cjepiva protiv virusa EBV.....	11
1.7 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR)	13
2. Cilj istraživanja	17
3. Materijali i metode.....	18
3.1 Biološki uzorci.....	18
3.2 Metode	18
3.2.1 Priprema reagensa za PCR u stvarnom vremenu	19
3.2.2 Programiranje i analiza rezultata na instrumentu <i>LightCycler 2.0</i>	20
3.2.3 Programiranje i analiza rezultata na instrumentu <i>LightCycler 480 II</i>	22
3.2.4 Statistička analiza	24
4. Rezultati	25
4.1 Usporedba broja kopija DNA EBV-a korištenjem dva testa	25
4.2 Statistička analiza rezultata usporedbe viremije i Ct vrijednosti u testovima kvantifikacije DNA EBV-a	26
5. Rasprava.....	30
6. Zaključak.....	33
7. Literatura.....	34

Popis kratica

BART RNA- BamHI-A regija desnog transkripta RNA

BL- Burkittov limfom

BZLF1- BamHI Z fragment lijevi otvoreni okvir za čitanje 1 (od eng. *BamHI Z fragment leftward open reading frame 1*)

CD21- klaster diferencijacije 21, (od eng. *cluster of differentiation 21*)

CD4+- pomoćnički T-limfociti

CD8+- citotoksični T-limfociti

CI- interval pouzdanosti

Cq- ciklus kvantifikacije (od eng. *quantification cycle*)

CR2- receptor komplementa tipa 2

EBER- molekula RNA kodirana virusom EBV

EBNA- nuklearni antigen virusa EBV

EBV- virus Epstein-Barr

FRET- fluorescentna rezonancija (od eng. *fluorescence resonance energy transfer*)

gB- glikoprotein ovojnice B

gH- glikoprotein ovojnice H

gL- glikoprotein ovojnice L

gp350- glikoprotein ovojnice 350

gp42- glikoprotein ovojnice 42

HLA- ljudski leukocitni antigen (od eng. *human leukocyte antigen*)

IL- interleukin

IRs- unutarnje ponavljajuće sekvence (od eng. *internal repeat sequences*)

JNK- c-Jun N-terminalna kinaza

LMP-latentni membranski protein

MHC II- glavni sustav tkivne podudarnosti klase II, (od eng. *major histocompatibility complex class II*)

miRNA- molekula mikroRNA

MS- multipla skleroza

NK-stanice- stanice ubojice (od eng. *natural killers*)

NPC- karcinom nazofarinksa (od eng. *nasopharyngeal carcinoma*)

ORF- otvoreni okvir čitanja (od eng. *open reading frame*)

oriLyt- početak litičke replikacije (od eng. *the origin of lytic replication*)

PDL1- Ligand programirane stanične smrti 1 (od eng. *Programmed Cell Death Ligand 1*)

PRR- receptori za prepoznavanje uzoraka (od eng. *pattern recognition receptors*)

qPCR- kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (od eng. *quantitative polymerase chain reaction*)

RIG-1- geni inducibilni retinoičnom kiselinom I (od eng. *retinoic acid-inducible gene 1*)

SNP- polimorfizam jednog nukleotida (od eng. *single nucleotide polymorphism*)

TGF- β - čimbenik rasta tumora beta (od eng. *tumor growth factor β*)

Th1- tip 1 pomoćnički T-limfociti (od eng. *Type 1 T helper cells*)

TNF - čimbenik nekroze tumora (od eng. *tumor necrosis factor*)

TPA- tkivni aktivator plazminogena (od eng. *tissue plasminogen activator*)

TRs- terminalna izravna ponavljanja (od eng. *terminal direct repeats*)

1. Uvod

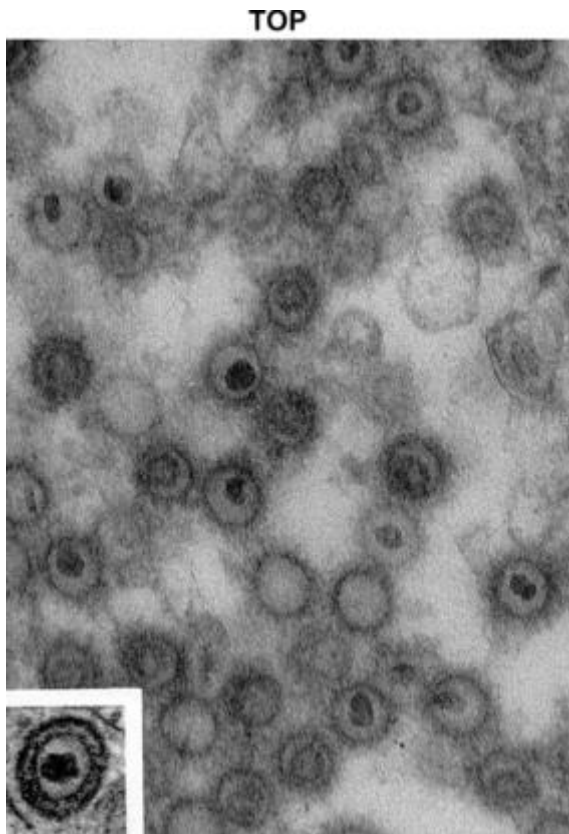
1.1 Virus Epstein-Barr

Virus Epstein-Barr (EBV) pripada redu *Herpesvirales*, porodici *Orthoherpesviridae*, podporodici *Gammaherpesvirinae* te rodu *Lymphocryptovirus*, a poznat je i pod nazivom ljudski gammaherpesvirus 4 (International Committee on Taxonomy of Viruses 2022). Virus EBV široko je rasprostranjen u populaciji na što ukazuje i podatak da 90% odrasle ljudske populacije ima protutijela specifična za ovaj virus. Infekcija ovim virusom najčešća je u ranom djetinjstvu, prije pete godine života, i tada većinom prolazi asimptomatski, dok infekcija u kasnijim periodima života najčešće uzrokuje pojavu infektivne mononukleoze, čiji je i najčešći uzročnik upravo EBV (Nowalk i Green, 2015). Virus EBV iskazuje značajan onkogeni potencijal i važan je etiološki kofaktor u razvoju karcinoma, poput Hodgkinova limfoma te karcinoma nazofarinksa i dr. (Patel i sur., 2022). Nadalje, dokazana je povezanost infekcije EBV-om s razvojem raznih autoimunih bolesti poput multiple skleroze te sistemskog eritemskog lupusa (Bjornevik i sur. 2022).

1.1.1 Otkriće virusa EBV

Priča o otkriću EBV-a započinje 1961. godine predavanjem kirurga Denisa Burkitta pod nazivom „Najčešći dječji rak u tropima Afrike: do sada neprepoznati sindrom“. Tema predavanja bila je specifičan limfom kojega je Burkitt otkrio tijekom rada u Ugandi. U pitanju su bili tumori koji zahvaćaju čeljust, abdomen, a ponekad i kosti te žlijezde slinovnice. Oboljeli su najčešće bili pedijatrijski pacijenti, a najveća prevalencija bila je u središnjoj Africi u području kojeg je nazvao „pojas limfoma“ (Esau, 2017). Spomenutom predavanju prisustvovao je virolog Anthony Epstein čija su istraživanja bila usmjerena na viruse koji uzrokuju tumore u pilića. Sumnjajući na virusnog uzročnika kao etiološkog kofaktora ove bolesti, A. Epstein i D. Burkitt intenzivno su surađivali te prikupljali uzorke bioptata oboljele djece. Nakon gotovo tri godine neuspješnih pokušaja izolacije i identifikacije nepoznatog virusa koristeći tradicionalne pristupe rada s virusnim kulturama, A. Epstein je u suradnji s virologinjom Yvonne Barr i patologom Bertom Achongom odlučio pokušati uzgojiti stanice tumora, sada već poznatoga kao Burkittov limfom (BL), *in vitro*. Znanstvenici su bili suočeni s izazovom da 1960-ih godina ljudski limfociti još nisu bili uspješno uzgojeni u kulturi. Do rješenja je došlo zahvaljujući slučajnom slijedu događaja; let iz Ugande za Englesku kojim su stanice limfoma stizale bio je preusmjeren i zbog toga je biopsija stigla u londonski laboratorij kasnije nego

očekivano. Transportni medij uzorka bioptata BL-a bio je mutan te nakon mikroskopskog pregleda u mediju su vizualizirane tumorske stanice te su na taj način uzgojene prve stanične linije limfoma čovjeka. Početkom 1964. Epstein je promatrao te stanice, koju su sada nosile naziv „EB1 stanična linija“ pod elektronskim mikroskopom i zamijetio virusne čestice, prikazane na Slici 1. Iz morfologije virusa zaključilo se da se radi o herpes virusu, sada poznatom po imenu virus Epstein-Barr ili EBV (Epstein, 2012) u čast Dr. Epsteinu i Yvonne Barr,

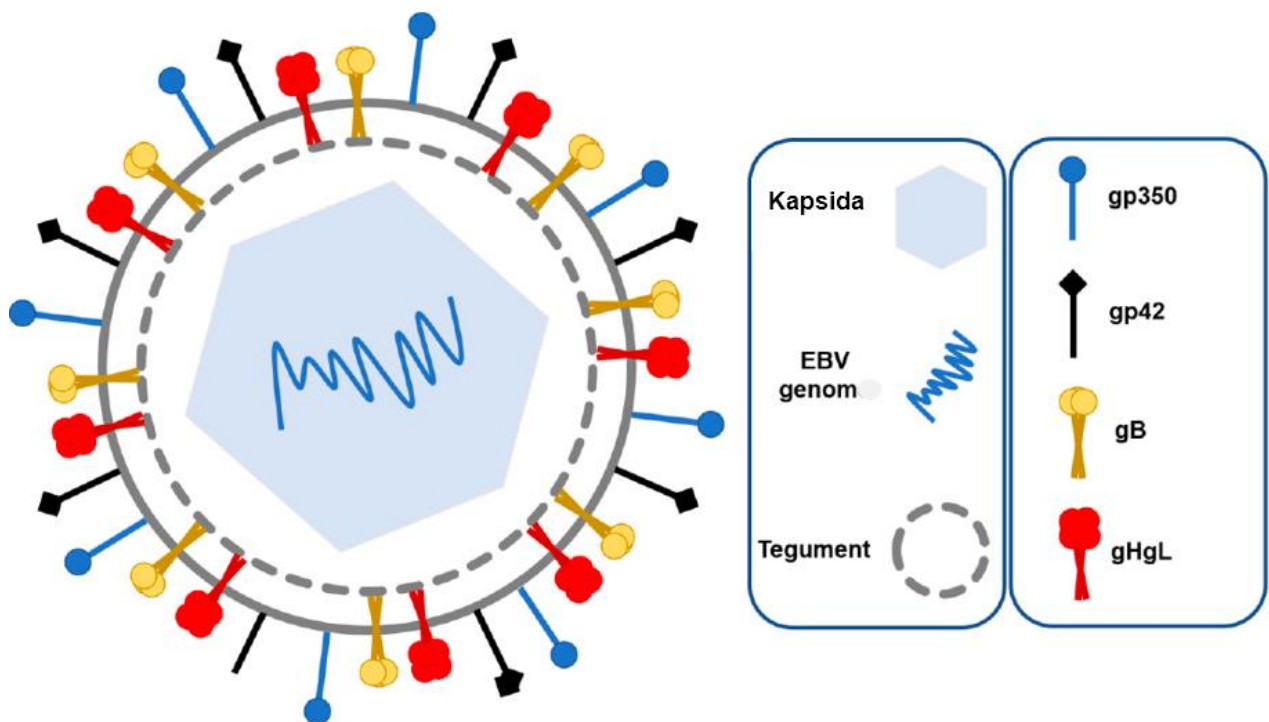


Slika 1. Prvi elektronski mikrograf čestica virusa Epstein-Barr (EBV). Zamjećuju se nezrele virusne čestice (gore) u zaraženoj stanici, a ispod je umetnuta fotografija zrele virusne čestice s ovojnicom. Temeljem ovih morfoloških obilježja postavljena je hipoteza o pripadnosti ovog virusa porodici Herpesviridae (Epstein, 2012)

1.1.2 Struktura i tropizam virusa EBV

Virion EBV-a sastoji se od dvolančane molekule DNA koja je zaštićena nukleokapsidom i okružena tegumentom te dvoslojnom lipidnom ovojnicom (Slika 2). Tegument je građen od različitih proteina koji imaju važnu ulogu u virusnoj replikaciji, reaktivaciji replikacije virusa ili prijenosu iz endosoma do jezgre B-limfocita. B-limfociti najvažnije su ciljne stanice za infekciju virusom EBV, no prije infekcije ovih stanica virus zaražava stanice epitela orofarniksa. Za fuziju viriona i membrana epitelnih stanica i B-limfocita nužni su specifični

glikoproteini koji se nalaze u ovojnici virusa (Slika 2). Primjerice, prilikom ulaska u epitelne stanice, virus EBV spaja svoju membranu izravno s membranom stanice domaćina, što aktivira glikoprotein gB, dok gH/gL kompleks ima regulacijsku ulogu u tom procesu. Fuzija viriona s membranom B-limfocita značajno je kompleksniji proces; početnu vezu s B-limfocitima uspostavlja virusni gp350 vežući se na stanični receptor komplekta tipa 2 (CR2), odnosno CD21- transmembranski protein nužan u razvoju imunološkog odgovora. Važnu ulogu u ovom procesu ima i virusni gp42 koji određuje tropizam viriona vežući se za molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti klase II (MHC II) čime započinje fuzija viriona i stanične membrane. Ovaj glikoprotein osigurava da jedan virion ne zarazi više od jedne stanice, s obzirom da se prilikom izlaska iz B-limfocita gubi. Nakon inicijalnog vezanja viriona i membrane započinje biološka aktivnost glavnih fuzijskih glikoproteina, to jest gB, gL i gH, koji su zajednički svim herpesvirusima. Glikoproteini gH i gL djeluju zajedno te vezanjem na integrin pokreću ulazak virusa EBV-a u epitelne stanice, a ukoliko tvore kompleks sa gp42 pospješuju vezanje za proteine MHC klase II (Rozman i sur., 2022).



Slika 2. Struktura viriona EBV-a (prilagođeno iz Rozman i sur., 2022)

1.2 Ustrojstvo genoma

Genom EBV-a linearna je dvolančana DNA molekula koja sadrži oko 172 kb. Genom virusa EBV prvi su sekvencirali R. Baer i sur. 1984. godine korištenjem M13 sekvenciranja (Baer i sur. 1984). U tom istraživanju korišten je B95-8 soj EBV-a, poznat kao uzročnik infektivne mononukleoze. Navedenom soju virusa EBV nedostaje segment genoma duljine 11,8 kb radi čega se u kasnijim istraživanjima sastavila hibridna sekvenca u kojoj je dio sekvence nadopunjen sekvenciranjem *Raji* soja EBV-a te je na taj način strukturirana sekvenca koja je reprezentativnija za većinu izolata ovog virusa. Nadalje, budući da je genom B95-8 sekvenciran iz biblioteke kloniranih fragmenata koristeći restriktijski enzim BamHI, otvoreni okviri čitanja (ORF), geni i mjesta za transkripciju ili obradu RNA često se odnose na specifične BamHI fragmente, imenovani slovima od A do Z ovisno o veličini fragmenta (Young i sur. 2007).

Genom EBV-a ima niz od 0,5 kb terminalnih izravnih ponavljanja (TRs od eng. *terminal direct repeats*) i unutarnjih ponavljajućih sekvenci (IRs od eng. *internal repeat sequences*) koji dijele genom na kratke i duge sekvencijske domene (Slika 2).

Genom EBV-a ima varijabilnost od tek 0,002% te se smatra stabilnim (Rozman i sur., 2022). Podjela virusnih varijanti može se napraviti na osnovu polimorfizama u genima za latenciju, primarno genima *EBNA-LP*, *EBNA2*, *EBNA3A*, *EBNA3B* i *EBNA3C*. Najčešća podjela jest na tipove 1 i 2, a najznačajnije razlike među njima su u geografskoj rasprostranjenosti te riziku od nastanka maligne transformacije stanica. Izolati virusa EBV tipa 1 prevladavaju u mnogim zapadnim i azijskim zemljama, a također je dokazano da su uspješniji u postizanju transformacije B-limfocita *in vitro*. Tip 2 virusa EBV manje je zastupljen u populaciji, a stanice transformirane ovim sojem u *in vitro* istraživanjima pokazuju sporiju kinetiku rasta u usporedbi sa stanicama inficiranim tipom 1 virusa (Tao i sur., 2006).

Na Slici 3. vidimo shematski prikaz EBV genoma, a istaknuti su najvažniji geni latentnog ciklusa virusa.

1.3 Replikacijski ciklus

U dosadašnjim istraživanjima biologije virusa EBV opisana su dva glavna tipa replikacijskog ciklusa; latentni i litički ciklus. Ukoliko je aktivan latentni ciklus virus se zadržava u jezgri stanice kao episom te se zbog ekstenzivnih epigenetskih promjena (na primjer metilacije DNA) proizvodi malena količina proteina specifičnih za ovaj ciklus (Hammerschmidt, 2015). Zahvaljujući takvom „tihom“ postojanju virus je u mogućnosti izbjeći imunski odgovor i zadržati se u organizmu tijekom dugog vremenskog perioda. Virus se u tom obliku razmnožava zajedno s domaćinskom stanicom; kada je domaćinska stanica u S fazi diobe virusni genom se udvostruči te se procesom mitoze raspodjeli u stanice kćeri. Suprotno tome, u litičkom ciklusu, svi litički geni EBV-a su eksprimirani, uključujući njegov vlastiti faktor transkripcije kao i katalitičku podjedinicu DNA polimeraze. To omogućava umnožavanje genoma do preko 100 puta te proizvodnju velikog broja novih virusnih čestica što uzrokuje prestanak rasta, a kasnije i smrt domaćinske stanice. Opisan je i prelazak iz jedne faze replikacijskog ciklusa u drugu (Slika 3); prelazak iz latentnog u litički ciklus naziva se reaktivacija, a može se potaknuti *in vitro* korištenjem određenih kemijskih ili bioloških agensa kao primjerice s TPA, natrijevim butiratom, anti-Ig, TGF- β i tako dalje. Prelazak iz litičkoga u latentni ciklus virusa (tzv. ponovno utišavanje) povezuje se na molekularnoj razini s virusom-potaknutom onkogenezom (Murata i Tsurumi, 2013).



Slika 4. Replikacijski ciklus EBV-a; latentna i litička faza. Tijekom latentne infekcije, sinteza molekule mRNA događa se samo s ograničenog broja latentnih gena. Reaktivacija iz latentne faze rezultira ekspresijom preko 80 gena, replikacijom virusne DNA te stvaranjem virusnog potomstva. Plavi, crveni i žuti krugovi označavaju virusne proteine koji su uključeni u virusnu replikaciju (prilagođeno iz Murata i Tsurumi, 2013)

1.3.1 Latentni ciklus

U latenciji eksprimirani su brojni geni i RNA virusa EBV: pet jezgrenih proteina virusa EBV (*Epstein-Barr virus nuclear antigen, EBNA*), dva latentna membranska proteina virusa (*LMP*), male virusne RNA molekule EBER (EBV-encoded small RNAs) i mikroRNA molekule kodirane regijom BART (BamHI-A regija desnog transkripta). Ovisno o obrascu ekspresije viralnih gena, latenciju dijelimo na tipove I, II i III. Latentni ciklus povezan je sa rastom i proliferacijom stanica koji vode do nastanka različitih tumora, a ponajviše latencija tipa III u kojoj je eksprimirano najviše produkata latentnih gena poput EBER1/2 RNA, EBNA-LP, EBNA-2, EBNA-3ABC, EBNA-1, LMP-2A/B, LMP-1 protein i BART RNA (Kang i Kieff, 2015). Upravo tada događa se i proces imortalizacije B-limfocita (Price i Luftig, 2014).

U procesu latencije vrlo značajnu ulogu ima protein EBNA-1 koji je neophodan za učinkovitu replikaciju i postojanost genoma EBV-a u stanici te za stabilnost i transkripcijsku aktivaciju stanica koje se dijele. Također je zaslužan za mnoge procese povezane s onkogenezom kao što su degradacija p53, induciranje miRNA povezane sa metastaziranjem, a djeluje i na signalni put faktora rasta TGF- β (od eng. *tumor growth factor β*). Virusni proteini EBNA-2 i EBNA-LP povezuju se s transkripcijskim faktorom vezanim uz uzvodne DNA elemente *cMyc* i *cMyc*-regulirane gene, tvoreći DNA petlju dugog dometa, što u konačnici dovodi do ulaska u stanični ciklus te proliferacije (Kang i Kieff, 2015).

Latentni membranski proteini 1 i 2 (LMP-1 i LMP-2), također neophodni za uspješno održavanje latentnog ciklusa, oponašaju biološku aktivnost molekula CD40 i receptora B-limfocita (BCR) te tako potiču konstitutivnu aktivaciju signalnih puteva koji sprječavaju apoptozu B-limfocita u fiziološkim uvjetima, što je nužan korak u njihovoj imortalizaciji. Gen *LMP-1* pojačano je eksprimiran u raznim tumorima zbog njegovog djelovanja na signalne putove posredovane molekulama NF- κ B, c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) i p38 (Kang i Kieff, 2015). Ostali proteini latencije također imaju specifične uloge u održavanju ciklusa, imortalizaciji B-limfocita i onkogenezi (Price i Luftig, 2014).

1.3.2 Litički ciklus

Litički geni EBV-a dijele se na neposredno rane, rane i kasne gene i eksprimiraju se kaskadno navedenim redoslijedom. Neposredno rani geni induciraju ekspresiju ranih gena, nakon čega slijedi sinteza virusne DNA. Zatim dolazi do ekspresije kasnih gena koji kodiraju za strukturne proteine i glikoproteine, a nukleokapsida se sastavlja u jezgri. Potom nukleokapsida pupa u

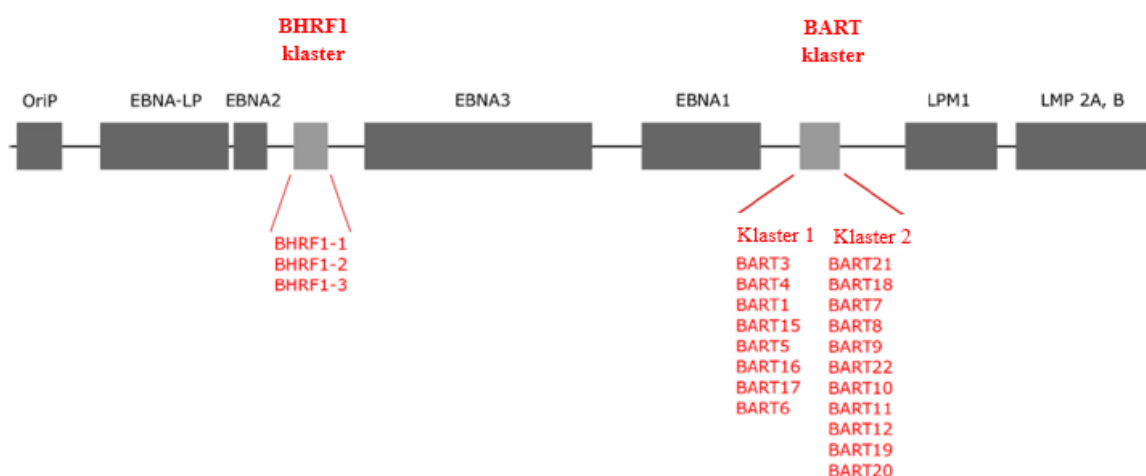
unutarnju jezgrinu membranu te skida ovojniciu na vanjskoj jezgrinoj membrani. Nakon dodavanja proteina tegumenta virus se ponovo omotava ovojnicom u citoplazmi te, u konačnici, izlazi u izvanstanični prostor (Murata 2018). Prijelaz iz latentnog u litički ciklus omogućuje ponajprije BZLF1 protein nazvan i molekularni prekidač za reaktivaciju EBV-a iz latencije. To je transkripcijski aktivator koji tvori homodimere i veže se na pripadajuće elemente u promotorima ranih litičkih gena te potiče njihovu transkripciju (Murata i Tsurumi, 2013). Drugi neposredno rani gen također je transkripcijski aktivator, *BRLF1*, koji se veže ili direktno na DNA preko svoje N-terminalne domene ili potiče transkripciju indirektno u interakciji sa drugim transkripcijskim faktorima. Takozvanih ranih gena ima mnogo i nužni su za uspješnu virusnu replikaciju. Primjerice, gen *BALF5* kodira DNA polimerazu, *BBLF4* helikazu, *BSLF1* primazu itd. Promotor litičkog ciklusa s kojeg kreće transkripcija svih pripadajućih gena naziva se *oriLyt* (Slika 2). Kasni geni zaslužni su za tvorbu strukturnih elemenata virusne čestice poput *BcLF1*, *BDLF1*, *BORF1*, *BFRF3* i *BBRF1* koji kodiraju proteine kapside, geni koji kodiraju 13 proteina tegumenta (*BVRF1*, *BGLF1*, *BNRF1* i tako dalje) te geni koji kodiraju glikoproteine (*BLLF1a/b* (gp350/220), *BALF4* (gB, gp110)). Koordinirana transkripcija navedenih gena omogućuje uspješnu replikaciju virusa i prijenos virusnih čestica (Murata 2018).

1.4 Imunosni odgovor na infekciju virusom EBV

Imunosni odgovor na EBV infekciju iznimno je varijabilan u populaciji čovjeka, te ovisi o genetskim čimbenicima domaćina, varijanti virusa, okolišnim čimbenicima te dobi zaražene osobe. Većina zaraza EBV-om prije pete godine života najčešće prolazi bez kliničkih simptoma, dok u adolescenciji u se kod dijela zaraženih osoba može razviti i infektivna mononukleoza. Tijekom infektivne mononukleoze dolazi do intenzivne proliferacije CD8⁺ T-limfocita i NK-stanica. Upravo zahvaljujući CD8⁺T stanicama koje prepoznaju određene virusne proteine latencije (EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP2) prezentacijom antigeničnih peptida putem molekula klase I glavnog sustava tkivne podudarnosti (eng. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) na antigen-prezentirajućim stanicama, većina zaraženih osoba zadržava cjeloživotni imunitet na ovaj virus, sa eventualnim reaktivacijama koje su najčešće povezane s periodima prolazne ili trajne deficijencije imunskog sustava. Važnu ulogu u imunskom odgovoru na virusne proteine, posebice na protein EBNA1, imaju i CD4⁺ T-limfociti. NK-stanice imaju važnu ulogu u kontroli virusne replikacije u sklopu aktivacije urođene imunosti tijekom primarne infekcije, ali i u litičkoj fazi infekcije, dok druge populacije limfocita poput NKT-stanica i $\gamma\delta$ T-limfocita ograničavaju virusnu replikaciju u fazama latencije tipa I i II.

Usprkos jakom imunom odgovoru organizma na infekciju, virus EBV uspješno održava dugotrajnu latentnu infekciju u B-limfocitima. Naime, EBV ima sposobnost virusom-potaknutog moduliranja važnih bioloških procesa u B-limfocitima te smanjivanja učinkovitosti mnogih urođenih i adaptivnih aspekata imunološkog sustava uz pomoć mnogih proteina koji moduliraju imunološki odgovor. Njihova aktivnost i uspješnost djelovanja ovisi o fazi virusnog ciklusa. Primjerice, protein EBNA1 može potaknuti indukciju regulatornih T-limfocita te suprimirati aktivnost NK-stanica djelujući na pripadajuće receptore. Protein EBNA2 ima mogućnost transkripcijske aktivacije mnogih gena uključenih u imunost odgovor kao primjerice faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF), limfotoksin- α , (interleukin-18R), IL-18R i PDL1 (Ligand programirane stanične smrti 1), a također inhibira sintezu antivirusnih citokina iz skupine interferona kao i ekspresiju gena MHC klase II. Virus EBV izbjegava efektorske mehanizme imunostnog sustava na različite načine: sintezom virokina tj. virusnog analoga citokina IL-10 koji ne potiče signalizaciju sa staničnog receptora te inhibira proupalni odgovor kao i putem virusnog proteina BNLF2a koji inhibira transporter povezan za procesiranje antigena (TAP) (Soldan i Lieberman, 2022).

Važan molekularni mehanizam u biologiji virusa EBV su molekule mikroRNA (miRNA) koje su važne za post-transkripcijsku regulaciju kako domaćinske tako i virusne genske ekspresije te utječu na staničnu proliferaciju, ali i apoptozu. Sekvenciranjem virusnog genoma pronađene su dvije sekvence (klasteri) koji sintetiziraju miRNA; BHRF1 klaster, čiji se produkti ekspimiraju samo u trećoj latentnoj fazi te Bart klaster, čije se miRNA ekspimiraju tokom cijele latencije (Slika 5). Obrasci ekspresije nisu jednaki u svakoj infekciji EBV-om već oni ovise o genomskoj varijanti virusa kojim je osoba zaražena.



Slika 5. Shematski prikaz genoma EBV-a s istaknutim klasterima koji kodiraju za miRNA molekule (prilagođeno iz Židovec Lepej i sur., 2020)

Molekule miRNA imaju važnu ulogu u izbjegavanju imunskog odgovora i omogućavanju dugogodišnje latentne infekcije. Ciljanjem signalnih putova posredovanih receptorima za prepoznavanje uzoraka (PRR, od eng. *pattern recognition receptors*) kao što su *Toll-like* i RIG-1 receptori, ove molekule interferiraju s prijenosom signala te posljedično inhibiraju sintezu interferona tipa 1 kao i ostalih proupalnih citokina koji su nužni za urođeni imunski odgovor. Molekule miRNA također smanjuju uspješnost prepoznavanja virusa uz pomoć NK-stanica smanjujući ekspresiju faktora rasta TGF- β 1, kao što i onemogućuju aktivnost inflammasoma ciljajući IL-1 receptor. Djelujući na proupalni citokin IL-12 koji je odgovoran za diferencijaciju naivnih CD4⁺ T-limfocita u zrele Th1 limfocite, povećanu sintezu IFN-a, aktivaciju NK- i T-limfocita kao i inhibiciju angiogeneze, suprimiraju uspjeh imunskog odgovora posredovanog CD8⁺ T-limfocitima. Modulacijom ekspresije kemokina virus izbjegava imunski odgovor posredovan Th1 limfocitima. Molekule miRNA također onemogućuju prezentaciju na svim razinama; od smanjenja ekspresije lizosomalnih enzima zaslužnih za procesiranje antigena, preko ciljanja transportera koji donosi peptide do MHC sustava do same prezentacije antigena smanjujući ekspresiju limfocitnog antigena 75 na dendritičkim stanicama. Uz to, imaju ključnu ulogu u djelovanju na adaptivnu staničnu imunost ciljajući razne regulatore odgovora T-limfocita pri čemu onemogućuju adekvatnu kontrolu replikacije EBV-a (Židovec Lepej i sur., 2020)

Kombinacijom svih navedenih mehanizama, virus EBV osigurava mogućnost doživotne infekcije zaražene osobe.

1.5 Virus EBV te povezanost s malignim i autoimunim bolestima

Nakon primarne infekcije, virus EBV ima sposobnost latencije u memorijskim B-limfocitima. Pri tome su osobe zaražene EBV-om izložene riziku od reaktivacije latentne infekcije u vrijeme stresa, infekcije ili imunosupresije. Osim direktnih posljedica koje može izazvati reaktivacija virusne infekcije, pogotovo u imunosuprimiranih bolesnika, u biomedicinskom smislu posebno je značajna uloga virusa EBV kao etiološkog kofaktora u razvoju određenih malignih bolesti kao što su nazofaringealni karcinom i Hodgkinov limfom, kao i nekih autoimunih bolesti primjerice multiple skleroze i sistemskog eritemskog lupusa (Patel i sur., 2022 i Soldan i Lieberman, 2022). Mehanizam djelovanja EBV-a na razvitak ovih bolesti objasniti ću na primjeru karcinoma nazofarinksa (NPC, od eng. *nasopharyngeal carcinoma*) i multiple skleroze (MS).

NPC karakteriziraju neoplastične modifikacije epitelnih stanica, a upravo njih EBV zaražava tijekom ulaska u organizam i uspostavljanja primarne infekcije. EBV ima mogućnost epigenetske modifikacije genoma domaćina modifikacijom histona i hipermetilacijom DNA. Navedene promjene mogu uzrokovati smanjenje regulacije tumor-supresorskih gena, smanjenje transkripcije proteina i inaktivaciju enzima za popravak DNA što potiče rast tumora. Nadalje, EBV može uzrokovati genomsku nestabilnost prelaskom između litičke i latentne faze; djelovanjem gena *BZLF1* koji zaustavlja stanični ciklus i gena *BRLF1* koji može uzrokovati nereguliran ponovni ulazak stanice u S fazu dolazi do poremećaja i u segregaciji kromosoma stanice. Također, EBV kao i mnogi uzročnici raka, ima ugrađene mehanizme za izbjegavanje imunološkog sustava što onda sprječava antitumorsku obranu organizma. Primjerice, male molekule RNA kodirane virusom- EBER mogu inaktivirati gene koje stimuliraju interferoni i sudjeluju u imunskoj obrani. EBV također kodira EBNA1 antigen koji omogućuje kemoatrakciju regulacijskih T-limfocita koje smanjuju imunološki odgovor na neoplastične NPC stanice (Patel i sur., 2022).

MS jedna je od najčešćih kroničnih upalnih i neurodegenerativnih bolesti središnjeg živčanog sustava i smatra se da u osoba s genetskom predispozicijom bolest može pokrenuti infektivni agens kao što je EBV. Važan mehanizam koji povezuje infekciju virusom EBV i MS, ali i druge autoimune bolesti jest molekularna mimikrija, a odnosi se na strukturalnu sličnost između stranih i vlastitih molekula, što može dovesti do takozvane križne reaktivnosti. T-limfociti iz bolesnika s MS koje su autoreaktivne na bazični protein mijelina (MBP) (što je karakteristika MS-a), iskazuju križnu reaktivnost s većim brojem virusnih peptida. Križna reaktivnost najznačajnija je u slučaju proteina EBNA1 jer nekoliko domena tog proteina nalikuje na različite dijelove domaćinskih proteina, ali je zabilježena i s ostalim proteinima EBV-a kao što su litički proteine BHRF1 i BPLF1. Mehanizam imortalizacije B-limfocita ima ulogu i u razvitku autoimunih bolesti; infekcija EBV-om potiče proliferaciju i preživljavanje memorijskih B-limfocita koje mogu promijeniti kontrolu T-limfocita kako nad EBV infekcijom, tako i nad autoimuno reaktivnim B stanicama i T stanicama, a olakšava preživljavanje samih autoreaktivnih B-limfocita (Soldan i Lieberman, 2022). Utjecaj EBV-a na razvoj tumora i autoimunih bolesti razlikuje se ovisno o tipu bolesti, ali općeniti mehanizmi slični su opisanim.

1.6 Izazovi u razvoju cjepiva protiv virusa EBV

Virus EBV iznimno je široko rasprostranjen virus koji uzrokuje različite bolesti čovjeka. Usprkos tome, za sada ne postoji profilaktičko ili terapijsko cjepivo protiv EBV-a koje je

odobreno za primjenu u čovjeka, a razlozi za navedenu situaciju su kompleksni. Prvi razlog je sama složenost životnog ciklusa virusa, kao i velik broj različitih proteina ovojnice. Kompleksnosti ovog problema pridonosi i činjenica da virus zaražava veći broj ciljnih stanica (epitelne stanice, B-limfociti, T-limfociti, NK-stanice) te da molekularni mehanizmi zaraze T-limfocita i NK-stanica za sada nisu poznati. Stoga je razvoj cjepiva koje bi spriječilo infekciju svih ciljnih stanica za infekciju EBV iznimno kompleksan proces. Uz to, problem predstavlja i nedostatak životinjskog modela za *in vivo* istraživanja, s obzirom da je infekcija ovim virusom zasad karakteristična za populaciju čovjeka. Mogući *in vivo* model su verirovke koje nakon infekcije virusom EBV mogu oboljeti od bolesti koja je slična infektivnoj mononukleozi u čovjeka, a njihov receptor CR2 koji je nužan za vezanje virusnog gp350 za stanicu sličan je analognoj molekuli u čovjeka u ključnim aminokiselinama značajnim za interakciju virusnog i staničnog receptora.

Veliki problem vezan za tip cjepiva kojim se želi spriječiti primarna infekcija upravo je nedostatak kontrolne skupine. Naime, s obzirom da je oko 90% stanovništva pozitivno na antitijela EBV-a, vrlo teško bi bilo pronaći ispitanike za istraživanja koji nikada nisu bili u kontaktu s virusom.

Trenutno postoje klinička istraživanja za dva tipa cjepiva: profilaktičko i terapijsko. Profilaktičko cjepivo zasniva se na stvaranju adaptivnog imunskog odgovora posredovanog neutralizirajućim antitijelima i sprečavanju primarne infekcije. Glavne mete ove vrste cjepiva su glikoproteini ovojnice koji su zaslužni sa inicijalno vezanje virusne čestice i B-limfocita. Ciljna molekula je glikoprotein gp350/220, tj. njegova N-terminalna regija od aminokiselina 1-470 koja je potrebna za vezanje za molekulu CR2 na B-limfocitima. Iako su ovi epitopi inducirali stvaranje antitijela u animalnim modelima, nisu pokazani zadovoljavajući rezultati u smislu opsega humoralne imunoreakcije. Jedan od novijih pristupa koji je još u fazi istraživanja jest bivalentno cjepivo napravljeno od dva antigena, gp350 i gH/gL/gp42, koje je pokazalo sprečavanje infekcije te pojave limfoma u humaniziranih miševa. Terapijska cjepiva osmišljena su za primjenu nakon primarne infekcije kako bi se ublažilo daljnje širenje i razvoj akutnih infekcija poput infektivne mononukleoze. Namijenjena su osobama s povećanim rizikom od malignih bolesti te posttransplantacijske limfoproliferativne bolesti. Jedan od načina stvaranja ovakvog cjepiva jest korištenje dendritičkih stanica. Dendritičke stanice prikupljaju se od bolesnika, a zatim se *ex vivo* stanicama dodaju antigenični epitopi viralnih proteina EBNA1 i LMP2, koji su odgovorni za transformaciju stanica u nazofaringealnom karcinomu, a zatim se vraćaju bolesniku. Međutim, iako dendritične stanice mogu uspješno aktivirati i CD4+ i CD8+

T-limfocite specifične za virusne proteine, *in vivo* je potrebno pažljivo kontrolirati stupanj aktivacije imunskog sustava što otežava primjenu ovog tipa cjepiva. Druga metoda je transformacija viralnih vektora poput Ankara i adenovirusog vektora s genima koji su biološki značajni tj. *EBNA1* ili *LMP1*. Prednost ove metode je snažna ekspresija molekularnih uzoraka povezanih s patogenima *in vivo*. Moguće je i kombinirati ove dvije metode; tj. prvo provesti postupak transdukcije autolognih dendritičnih stanica s rekombinantnim adenovirusom koji kodira virusne proteine LMP1 i LMP2 te korištenje tih stanica u stimulaciji T-impocita, no željeni odgovor nije postignut.

Najnovija metoda u svijetu razvoja cjepiva jest korištenje mRNA molekula, te ova vrsta istraživanja postoji i za stvaranje cjepiva protiv EBV-a. Na primjer, razvija se cjepivo koje se sastojalo od pet molekula mRNA koje kodiraju za glikoproteine gp350, gB, gH, gL i gp42 s ciljem sprečavanja primarne infekcije i smanjenja pojavnosti infektivne mononukleoze. Unatoč svim navedenim pokušajima i istraživanjima kroz posljednjih nekoliko desetljeća, uspješno cjepivo protiv EBV-a još ne postoji. Sudeći po dosadašnjem napretku, stvaranje terapijskog cjepiva trebalo bi biti moguće u budućnosti, dok je sprečavanje primarne infekcije profilaktičkim cjepivom zasada teško moguće zbog složenog mehanizma infekcije kao i širokog raspona tropizma stanica domaćina (Rozman i sur., 2022).

1.7 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR)

Higuchi i sur. osmislili su 1992. godine način za detekciju umnožavanja DNA tijekom trajanja PCR reakcije. Proces je bio baziran na fluorescenciji etidijevog bromida u prisutnosti dvolančane DNA, što je omogućilo praćenje odvijanja PCR reakcije „bez otvaranja reakcijske tubice“. Taj eksperiment bio je preteča jedne od važnijih i široko korištenih metoda u molekularnoj biologiji, kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu, ili takozvanog qPCR-a. Moderna inačica ove metode također se bazira na pojačavanju fluorescencije rastom broja molekula DNA, ali umjesto etidijevog bromida koriste se nespecifične fluorescentne DNA boje ili fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. U početnim ciklusima razina fluorescencije je niska i ne razlikuje se od pozadinske, ali u jednom trenu dođe do točke u kojoj postaje detektabilna, a ta se točka naziva ciklusom kvantifikacije (Cq). Vrijednost Cq ovisi o početnom broju DNA molekula u uzorku kojeg se analizira.

Upravo je mogućnost kvantifikacije početne količine nukleinskih kiselina u uzorku ono što čini ovu metodu izrazito bitnom u područjima molekularne biologije, infektologije, biomedicine, ekologije i dr. (Kralik i Ricchi, 2017). Postoje dvije vrste kvantifikacije u qPCR metodi;

apsolutna i relativna. Apsolutnu kvantifikaciju koristimo kako bi odredili točnu količinu prisutne DNA kalupa, a najčešće korištena metoda jest metoda standardne krivulje. Ta metoda temelji se na postojanju standarda u reakciji, to jest DNA ili RNA čija je koncentracija unaprijed poznata. Umnožavanjem standarda dobijemo takozvanu standardnu krivulju s kojom možemo uspoređivati nepoznate vrijednosti te ekstrapolirati vrijednost. Apsolutna kvantifikacija koristi se, među ostalim, u biomedicinskim istraživanjima te dijagnostici u svrhu dobivanja količine virusnog materijala u uzorcima, pa je tako ta metoda korištena i u ovom istraživanju. Druga vrsta kvantifikacije naziva se relativnom i koristi se za analizu ekspresije gena. Bazira se na usporedbi ekspresije ciljnog gena sa onom od odabranog takozvanog „housekeeping“ gena, gena koji je konstantno i jednako eksprimiran u stanici. Najčešće korištena metoda u ovom tipu kvantifikacije jest $\Delta\Delta C_t$ metoda, kojom iz C_t vrijednosti ciljnog i kontrolnog gena nizom formula dobijemo informacije o genskoj ekspresiji (ThermoFisher 2024, BiteSizeBio 2024).

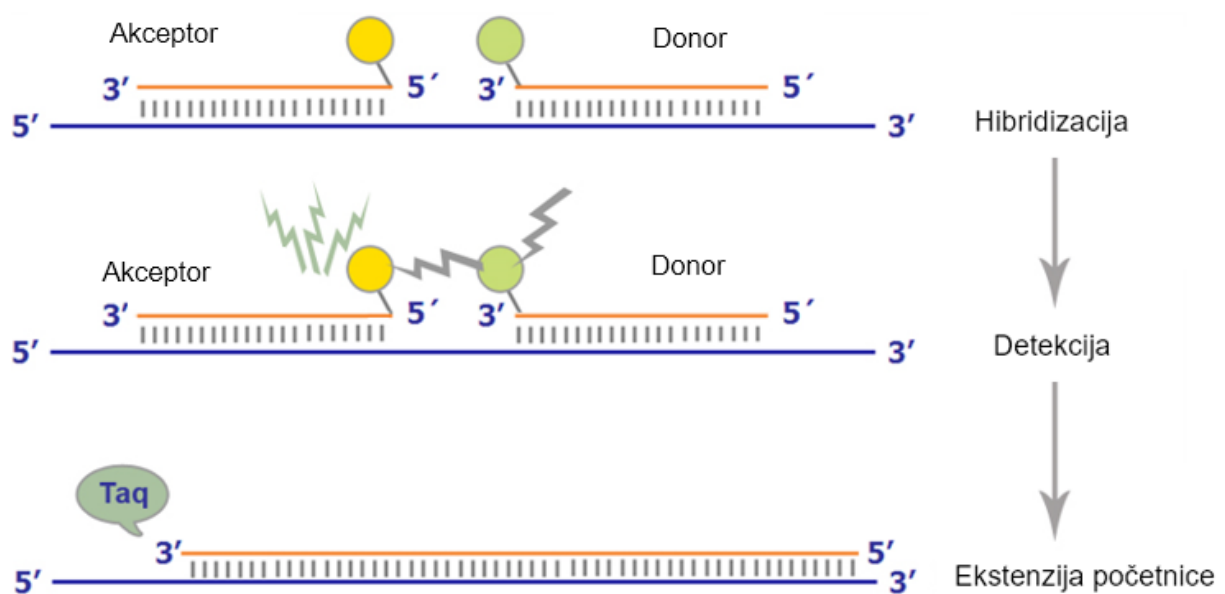
1.7.1. Biokemijska osnova qPCR-a

U praćenju tijeka PCR reakcije koriste se dva načina: metode koje omogućuju specifičnu i nespecifičnu detekciju produkta koristeći boje koje se vezuju na dvolančanu DNA te one metode koje uz pomoć oligonukleotida sa vezanim fluoroforom detektiraju samo specifične PCR produkte (Navarro i sur. 2014). Biolozi su dizajnirali velik broj različitih boja i proba koje su danas široko dostupne, a njihove mehanizme djelovanja objasniti će na primjeru često korištene boje *SYBR Green* te hibridizacijskih proba, koje su i korištene u ovome istraživanju.

SYBR Green cijaninska je boja asimetrične molekularne građe koja sadrži dva pozitivna naboja što u standardnoj PCR reakciji doprinosi njenom visokom afinitetu vezanja za dvolančanu DNA. Princip korištenja ovakvih boja leži u njihovoj pojačanoj fluorescenciji prilikom vezanja za dvolančane DNA molekule čiji se broj povećava kroz napredovanje PCR reakcije. Zbog njihovog nespecifičnog vezanja predlaže se dodatna analiza krivuljom topljenja u svrhu provjere točnosti vezanja. S druge strane, prednost korištenja ove metode nad metodom fluorescentnih proba jest njena niža cijena. Primjena *SYBR Green*, kao i ostalih sličnih boja jest široka, koriste se za detekciju patogena, praćenje genske ekspresije, detekciju mutantnih varijanti i SNP-ova te mnoge druge (Navarro i sur. 2014).

Hibridizacijske probe sastoje se od dva kratka, različita oligonukleotida koji se vežu na internu sekvencu fragmenta koji se umnaža tijekom faze prijanjanja za vrijeme trajanja amplifikacijskog ciklusa. Naziv hibridizacijske probe koja se koristila u ovome istraživanju jest *Red* valne duljine 640 nm. U toj probi, jedan oligonukleotid označen je na 5' kraju sa *LightCycler Red 640*, dok

je na 3' kraju modificiran fosforilacijom kako bi se spriječilo produljivanje. Drugi oligonukleotid na 3' kraju označen je fluoresceinom. Kada probe hibridiziraju sa molekulom DNA budu u neposrednoj blizini jedna drugoj što omogućuje prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (FRET, od eng. *fluorescence resonance energy transfer*) između dva fluorofora (mehanizam prikazan na Slici). Tijekom FRET-a, izvor svjetlosti qPCR instrumenta pobuđuje donorski fluorofor fluorescein te se dio ekscitacijske energije prenese na akceptorski fluorofor, *LightCycler Red 640*. Fluorescencija koju on emitira zabilježi se *LightCycler* instrumentom. Ukoliko želimo pratiti umnažanje interne kontrole koristimo isti mehanizam, ali proba koju koristimo naziva se *LightCycler Red 690* (priručnik za korištenje *LightCycler® EBV Quantification Kit*, 2002). Prednost ovih, ali i ostalih hibridizacijskih probi jest njihov jednostavni dizajn i sinteza, kao i mogućnost kvalitetne optimizacije uvjeta PCR reakcije. Opisane probe mogu se koristiti za detekcija te kvantifikaciju prisutnosti patogena, genotipizaciju, detekciju mutacija i SNP-ova i dr. (Navarro i sur. 2014).



Slika 6. Princip djelovanja hibridizacijskih proba (preuzeto i prilagođeno sa *DNA universe*)

1.8. Primjena kvantifikacije EBV DNA u biomedicini

U biomedicini postoji mnogo načina dijagnosticiranja virusne infekcije, a jedna od njih jest mjerenje količine genomske RNA ili DNA patogenih mikroorganizama za koje se pretpostavlja da su etiološki čimbenici bolesti pri čemu se u kliničkim laboratorijima široko primjenjuje metoda qPCR (Huh i sur., 2016). Kvantifikacija DNA EBV-a može nam dokazati da je upravo

virus EBV uzročnik infekcije i omogućiti postavljanje točne dijagnoze. Također, omogućuje nam praćenje progresije bolesti praćenjem promjene broja kopija DNA kroz određen vremenski period. Posebnu važnost nosi praćenje količine DNA EBV-a u krvi imunokompromitiranih bolesnika, poput pacijenata koji su liječeni transplantacijom. Kinetika virusne replikacije koja se procjenjuje određivanjem količine DNA EBV-a najčešće se povezuje sa simptomima pojedinih bolesti (Lay i sur., 2010). Prediktivna vrijednost kvantifikacije DNA EBV-a istražuje se i u drugim modelima infektivnih i neinfektivnih bolesti čovjeka. Npr. Alberti i suradnici (2023) su objavili rad u kojem su utvrdili da se kvantifikacija DNA EBV-a iz plazme može koristiti kao prognostički čimbenik kod raka želuca povezanog s EBV-om.

Usprkos brojnim dokazima o važnosti kvantifikacije DNA EBV-a u biomedicinskim istraživanjima, međulaboratorijske usporedbe pokazale su značajnu varijabilnost u mjerenje količine prisutne virusne DNA. Posebno je važno istaknuti da su literaturni podatci o usporedbi količine DNA EBV-a mjerene različitim molekularnim testovima u nekim slučajevima pokazali značajne analitičke razlike koje posljedično mogu imati značajan učinak i na interpretaciju biološke značajnosti analitičkih rezultata (Herdina i sur. 2022, Stelzl i sur. 2023, Vancutsem i sur. 2023). Stoga nedvojbeno postoji potreba za usporedbom rezultata kvantifikacije DNA EBV-a mjerene različitim molekularnim testovima na različitim biološkim uzorcima te je nužno proširiti i znanje o usporedbi primjene testova na različitim generacijama PCR uređaja koji se koriste u biomedicinskim istraživanjima (Huh i sur., 2016). Posebno je značajno provesti usporedna testiranja u slučaju prestanka primjene određenog molekularnog testa te, u slučaju statistički značajnih razlika u viremiji dobivenih standardnim odnosno novim molekularnim testom, razmotriti interpretaciju eventualnih promjena u kinetici virusne replikacije tijekom vremena u različitim modelima biomedicinskih istraživanja kao i biološku važnost diskordantnih rezultata.

2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je, po prvi puta, usporediti broj kopija DNA EBV-a u uzorcima periferne krvi određenih primjenom dvaju standardiziranih kvantitativnih PCR testova u stvarnom vremenu te utvrditi da li su rezultati procjene kinetike virusne replikacije usporedivi i primjenjivi u biološkim i biomedicinskim istraživanjima.

3. Materijali i metode

3.1 Biološki uzorci

U ovom je istraživanju korišteno 100 uzoraka DNA izolirane iz periferne krvi ispitanika koji su uključeni u znanstveno-istraživački projekt „Molekularna raznolikost virusa Epstein-Barr“ (šifra projekta IP-2020-02-8961, Hrvatska zaklada za znanost, HRZZ). Navedeni projekt kao i istraživanje u sklopu ovog diplomskog rada provedeni su u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti odobrilo je ovo istraživanje na sjednici održanoj 28.08.2019.g. (ur.broj. 01-1247-3-2019).

DNA iz odabranih bioloških uzoraka izolirana je uz primjenu standardiziranog kompleta reagensa QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) koji je optimiziran za izolaciju oko 6 µg ukupne DNA (genomske, viralne, mitohondrijske) iz 200 µL perferne krvi s antikoagulansom etildiamintetraoctena kiselina. Uzorci DNA bili su pohranjeni u biobanci HRZZ projekta IP-2020-02-8961 na -20°C do analize u sklopu ovog istraživanja. Biološki uzorci prikupljeni su od ispitanika oboljelih od infektivne mononukleoze i drugih bolesti u kojima je virus EBV jedan od značajnih etioloških čimbenika.

3.2 Metode

U ovom sam istraživanju usporedila rezultate kvantifikacije DNA EBV-a metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu primjenom dvaju standardiziranih testova na različitim instrumentima za amplifikaciju nukleinskih kiselina:

1. test *LightMix for the detection of EBV DNA* na instrumentu *LightCycler 2.0*. (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka, Slika 6) koji je standardna metoda u Klinici za infektivne bolesti za kvantifikaciju DNA EBV-a i
2. novi test *LightMix for the detection of EBV DNA s adaptiranim protokolom* na instrumentu nove generacije *LightCycler 480 II* (Roche Diagnostics, Slika 7) koji će biti evaluiran u sklopu ovog istraživanja.

Oba testa temelje se na uporabi specifičnih početnica za umnožavanje fragmenta veličine 166 parova baza gena *EBNA-2* koji kodira za jezgreni protein virusa EBV. U oba molekularna testa, reakcijska smjesa za PCR sastoji se od molekule DNA, specifičnih početnica, reagensa *FastStart Master HybProbe* (Roche Diagnostics koji sadrži 10x koncentrirane komponente za stvaranje reakcijske smjese (*FastStart Taq* DNA polimeraza, reakcijski pufer, dNTP-ovi pomiješani sa dUTP-ovima umjesto dTTP-ovima i 10 mM MgCl₂), 25mM otopinu MgCl₂, te

vodu za PCR (voda specifično pročišćena od nukleaza, RNAza, DNA molekula i kemijskih kontaminanata u svrhu korištenja u PCR reakciji), dok se umnoženi produkti PCR reakcije detektiraju uz pomoć hibridizacijske probe Red valne duljine 640 nm (kanal 640). Jednaku probu koristimo i pri izradi negativne kontrole. Granice detekcije oba PCR testa u stvarnom vremenu iznose 10 kopija DNA EBV-a po mL pri čemu je linearno područje kvantifikacije 10^2 do 10^6 kopija DNA EBV-a. U istraživanju sam koristila i interne kontrole koje se sastoje od DNA virusa Lambda i PhV, a koja se detektira uz pomoć hibridizacijske probe Red valne duljine 690 nm (kanal 705), negativnu kontrolu, kao i kvantifikacijske standarde koji se sastoje od purificirane klonirane DNA EBV-a poznate koncentracije (od 10^1 do 10^5 kopija). Rezultati testova dobiveni su analizom krivulje taljenja nakon završetka reakcije PCR-a u stvarnom vremenu.



Slika 7. Instrument *LightCycler 2.0*.



Slika 8. Instrument *LightCycler 480 II*

3.2.1 Priprema reagensa za PCR u stvarnom vremenu

Pripremu reakcijske smjese za PCR u stvarnom vremenu započela sam dodavanjem 66 μ L vode za PCR 2 μ L Parametar-specifičnog reagensa (PSR) u epruvetu s reagensom za PCR koji sadrži prethodno izmiješane liofilizirane početnice i probe te kratko centrifugirala na 1500g, a u epruvetu za kontrolnu PCR reakciju dodala sam 1200 μ L vode za PCR. Za pripremu negativne kontrole pomiješala sam 900 μ L vode za PCR sa 100 μ L pripremljenog reagensa za kontrolnu reakciju.

Reakcijsku smjesu pripremila sam prema shemi prikazanoj u Tablici 1, množeći navedene količine s brojem za jedan većim od broja uzoraka koje sam testirala u određenoj grupi

ispitivanih uzoraka (računajući i pozitivnu kontrolu, negativnu kontrolu te kvantifikacijske standardne pripravke).

Tablica 1. Upute za pripremu reakcijske smjese

Komponenta	Pojedinačna reakcija (volumen)
dH ₂ O	6,35 µL
Mg ²⁺ otopina 25 mM	2,4 µL
PSR mix (parametar-specifični reagens)	2,0 µL
Početnice i probe za kontrolnu reakciju	0,25 µL
Reagens kontrolne reakcije	2,0 µL
Reakcijska smjesa za PCR	2,0 µL
Ukupan volumen reakcijske smjese	15,0 µL

Nakon pripreve reakcijske smjese, kratko sam centrifugirala epruvete te prebacila po 15 µL smjese u svaku od jažica mikrotitracijske pločice ili kapilare za PCR reakciju (ovisno o instrumentu), te dodala po 5 µL uzorka DNA u sve jažice osim jedne u koju sam dodala 5 µL standarda. Napunjene jažice sam zatvorila i postavila u prethodno kodirano ciljano mjesto na instrumentu te pokrenula izvođenje reakcije.

Postupak programiranja instrumenata za PCR u stvarnom vremenu kao i metoda analize rezultata na ova dva instrumenta značajno su različiti te su zasebno opisani.

3.2.2 Programiranje i analiza rezultata na instrumentu *LightCycler 2.0*

Program uređaja sastoji se od 4 koraka reakcije PCR-a u stvarnom vremenu pri čemu su svi parametri reakcije pojedinačno opisani u Tablici 2.:

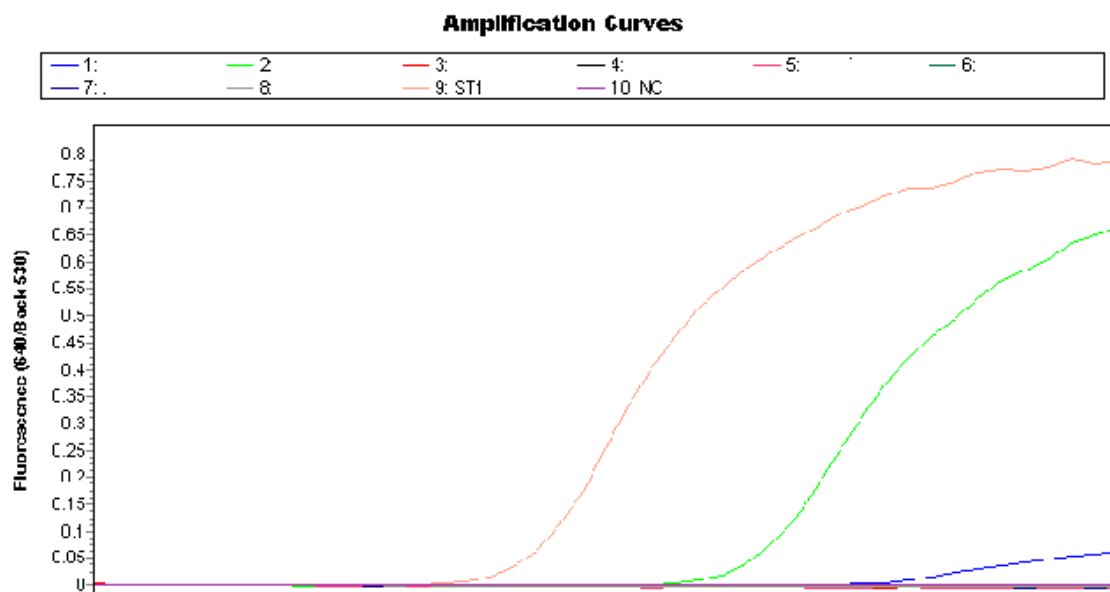
- denaturacija (denaturacija uzorka i aktivacija enzima),
- amplifikacija (PCR amplifikacija ciljane DNA),
- taljenje (analiza krivulje taljenja za identifikaciju PCR produkta dobivenoga iz ciljane DNA),
- te hlađenje (hlađenje instrumenta).

Prije samog pokretanja reakcije pokrenut je program kompenzacije boja, a korištena metoda je maksimum druge derivacije.

Tablica 2. Program izvođenja PCR reakcije na *LightCycler 2.0* uređaju

Parametri	Denaturacija	Amplifikacija			Taljenje			Hlađenje
<i>Način analize</i>	/	Kvantifikacijski			Krivulje taljenja			/
<i>Ciklusi</i>	1	50			1			1
<i>Ciljna temperatura [°C]</i>	95	95	62	72	95	40	85	40
<i>Trajanje [hh:mm:ss]</i>	00:10:00	00:00:05	00:00:05	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
<i>Ramp Rate [°C/s]</i>	20	20	20	20	20	20	0.2	20
<i>Sec Target [°C]</i>	-	-	55	-	-	-	-	-
<i>Step Size [°C]</i>	-	-	0.5	-	-	-	-	-
<i>Step Delay (Cycles)</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Acquisition Mode</i>	/	/	Jedan	/	/	/	Cont:	/

Nakon završetka reakcije PCR-a u stvarnom vremenu program instrumenta kreira krivulje amplifikacije i taljenja. Analiza rezultata započinje provjerom rezultata vidljivih na kanalu pod brojem 604 koji se odnosi na negativnu kontrolu. Tijekom analize provjerila sam rezultate te utvrdila da negativna kontrola ne daje signal amplifikacije te na taj način potvrdila da tijekom izvođenja PCR-a u stvarnom vremenu nije došlo do kontaminacije ili nespecifične amplifikacije tj. da mogu pristupiti analizi rezultata bioloških uzoraka. Rezultate pozitivne kontrole provjerila sam analizom podataka vidljivim na kanalu 705. Vjerodostojan PCR test u stvarnom vremenu nema signala pri analizi negativne kontrole no pokazuje amplifikaciju pozitivne kontrole. Dodatni kriterij vjerodostojnosti umnožavanja ciljnog fragmenta je umnožavanje interne kontrole (za negativne rezultate), dok u pozitivnim uzorcima umnožavanje interne kontrole nije obvezno. U dijelu programa „Krivulje taljenja“ vidljivi su rezultati kvantifikacije DNA EBV-a (Slika 8.) pri čemu uzorci DNA s koncentracijama u rasponu od 10^6 kopija/reakciji do 10^1 kopija/reakciji trebaju imati Ct vrijednosti između 17. i 35. ciklusa.



Slika 9. Prikaz amplifikacijske krivulje dobiven na instrumentu *LightCycler 2.0*. U legendi iznad krivulja vidimo brojeve nanesenih uzoraka i boje pod kojima se vide njima pripadajuće krivulje. Brojevima 1-7 označeni su uzorci koji se analiziraju, pod brojem 9 nalazi se standard, a pod brojem 10 negativna kontrola. X os označava prolazak ciklusa dok je na y osi označena zabilježena fluorescencija pod kanalom 640. Prikazani rezultat je validan s obzirom na to da se negativna kontrola nije umnožila, a standard, uz pomoć kojega program izračuna i vremenu uzoraka, jest. Uzorci pod brojevima 2 i 7 smatraju se pozitivnima s obzirom da je zabilježeno umnožavanje i vidimo njihovu amplifikacijsku krivulju.

3.2.3 Programiranje i analiza rezultata na instrumentu *LightCycler 480 II*

U sklopu pripreme za rad na instrumentu označila sam popunjene jažice mikrotitracijske pločice, programirala sam instrument za rad u modelu apsolutne kvantifikacije te prije započinjanja reakcije upisala podatke o kvantifikacijskim standardima.

Program instrumenta *LightCycler 480 II* sastoji se od četiri koraka koji su identični prethodno opisanim koracima za instrument *LightCycler 2.0* tj. od denaturacije, amplifikacije, taljenja te hlađenja. Program izvođenja PCR reakcije prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Program izvođenja PCR reakcije na *LightCycler 480 II* uređaju

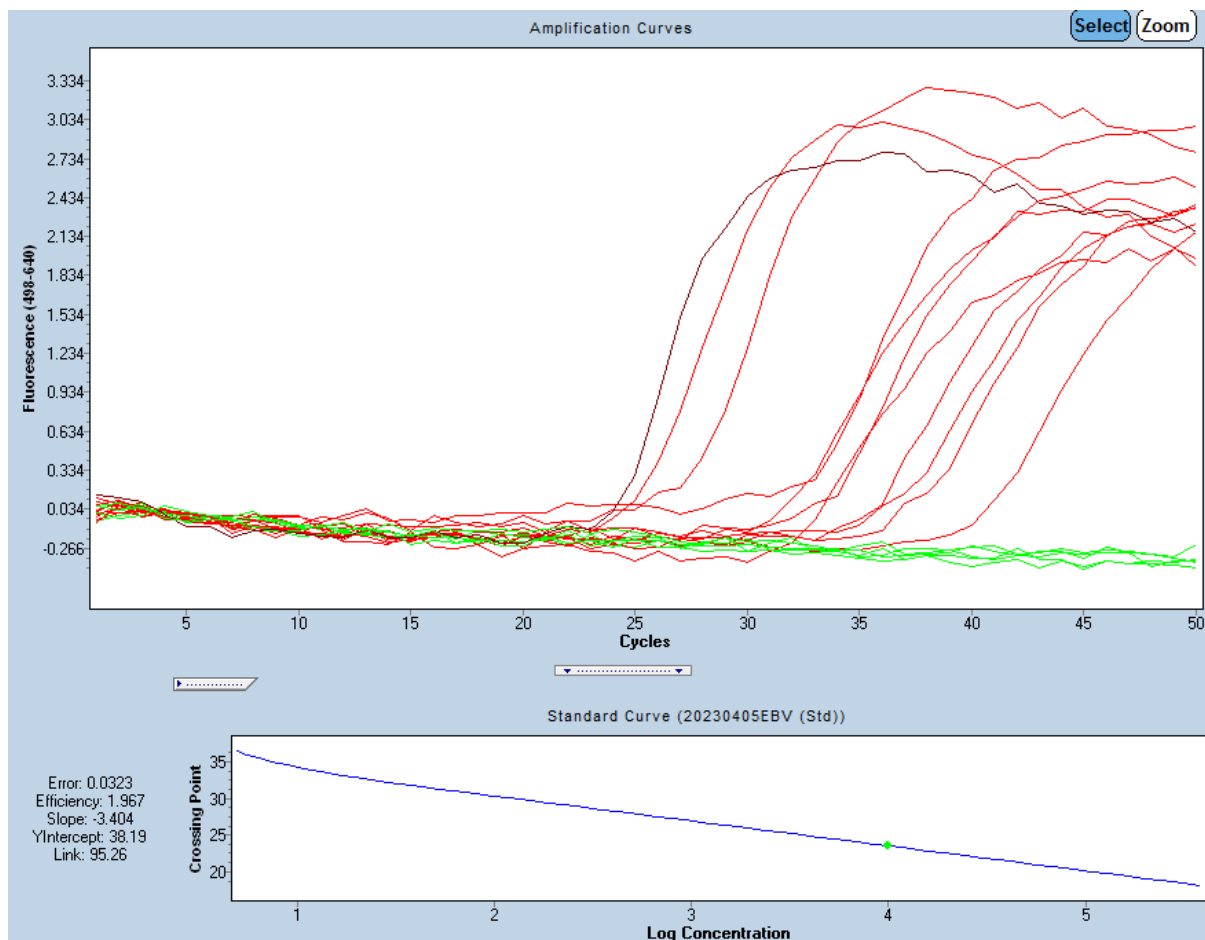
Parametri	Denaturacija	Amplifikacija			Taljenje			Hlađenje
<i>Način analize</i>	/	Kvantifikacijski			Krivulje taljenja			/
<i>Ciklusi</i>	1	50			1			1
<i>Ciljna temperatura [°C]</i>	95	95	62	72	95	40	85	40
<i>Trajanje [hh:mm:ss]</i>	00:10:00	00:00:05	00:00:05	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30

<i>Ramp Rate [°C/s] 96</i>	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
<i>Ramp Rate [°C/s] 384</i>	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
<i>Sec Target [°C]</i>	-	-	55	-	-	-	-	-
<i>Step Size [°C]</i>	-	-	0.5	-	-	-	-	-
<i>Step Delay (Cycles)</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Acquisition Mode</i>	/	/	Jedan	/	/	/	Cont:	/
<i>Acquisitions [per °C]</i>	-	-	-	-	-	-	1	-

Nakon završetka PCR reakcije, u programu sam odabrala mogućnost analize u modelu apsolutne kvantifikacije, analize više boja (opcija *multicolor analysis*) te analize krivulje PCR reakcije (metoda druge derivacije).

Rezultate kvantifikacije DNA EBV-a u biološkim uzorcima analizirala sam kombinacijom valnih duljina 498-640 nm pri čemu sam očekivala da u uzorcima s mjerljivom DNA EBV-a s koncentracijama u rasponu od 10^6 kopija/reakciji do 10^1 kopije/reakciji Ct vrijednost treba biti između ciklusa 17 i 35, negativna kontrola ne bi smjela pokazivati bilo kakav amplifikacijski signal, a prisutnost interne kontrole sam provjeravala kombinacijom valnih duljina 498-660 nm.

Tumačenje rezultata jednako je kao i prethodno opisano za uređaj *LightCycler 2.0*.



Slika 10. Prikaz amplifikacijske krivulje dobiven na instrumentu *LightCycler 480 II*. Na x osi vidimo brojeve ciklusa dok je na y osi označena zabilježena fluorescencija na valnim duljinama 498-640 nm. Ispod slike krivulja vidljiva je standardna krivulja uz pomoć koje program izračuna viremiju. Nazivi uzoraka bili bi vidljivi potezom miša preko zasebnih amplifikacijskih krivulja. Uzorci koji zabilježavaju umnožavanje rastom amplifikacijske krivulje prije 35.ciklusa smatraju se pozitivnima.

Bitna razlika između dva opisana testa jest način u načinu detekcije fluorescentnih signala. Koristeći *LightCycler 2.0* uređaj provjeravamo umnožavanje EBV DNA u kanalu 640, a interne kontrole u kanalu 705, što znači da se signal detektira samo na valnoj duljini od 640, odnosno 705 nanometara. Krivulje dobivene analizom na *LightCycler 480 II*. uređaju proučavamo pod kombinacijom filtera 498-640 (645) nm za EBV DNA, a 498-660 (700) nm za internu kontrolu. Taj princip omogućuje nam detekciju signala ne samo na valnoj duljini od 640 nm odnosno 705 nm, već i na valnim duljinama unutar tog raspona, sve do 640 (ili 645) odnosno 660 (ili 700) nanometara, što može dovesti do veće osjetljivosti korištene metode.

3.2.4 Statistička analiza

Statistička analiza u ovom radu za izradu statističkih testova i grafova usporedbe dva testa rađena je u programu R (verzija 4.2.1.) (R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Izračuni analize podataka o pacijentima rađeni u programu Microsoft Excel 2016 (Verzija 2312).

4. Rezultati

Ukupno 100 uzoraka periferne krvi uključeno je u ovom istraživanju i analizirano qPCR testovima u stvarnom vremenu (standardni *LightMix* test na instrumentu *LightCycler 2.0* i *LightMix* test s adaptiranim protokolom na instrumentu nove generacije *LightCycler 480 II*). Rezultati analize svih ispitivanih bioloških uzoraka bili su validni tj. nije bilo inhibicije PCR reakcije. U ovom sam istraživanju analizirala i usporedila rezultate dvaju testova te odredila broj uzoraka s nemjerljivom te uzoraka s mjerljivom viremijom te njihovu podudarnost. Za uzorke u kojima je viremija tj. broj kopija DNA EBV-a bio mjerljiv, odredila sam i usporedila vrijednost viremije te Ct vrijednosti. Također sam analizirala omjer spolova ispitanika, usporedila raspon njihove dobi te analizirala pojavnost određenih dijagnoza ispitanika koji su uključeni u ovo istraživanje.

4.1 Usporedba broja kopija DNA EBV-a korištenjem dva testa

Rezultati kvantifikacije DNA EBV-a primjenom dvaju molekularnih testova kao i usporedba viremija i Ct vrijednosti svih ispitanih uzoraka prikazani su u Tablici 4. Vrijednost viremije izražena je kao broj kopija DNA EBV-a po ml periferne krvi ispitanika.

Tablica 4. Rezultati analize bioloških uzoraka uzoraka na instrumentima *LightCycler 2.0* i *LightCycler 480 II*. Drugi i treći stupac odnose se na vrijednosti dobivene kvantitativnim PCR testom u stvarnom vremenu *LightMix for detection of EBV DNA* na *LightCycler 2.0* uređaju, dok se četvrti i peti stupac odnose na rezultate dobivene *LightMix testom s adaptiranim protokolom* na *LightCycler 480 II* uređaju. Uzorci u kojima nije detektirana prisutnost EBV DNA označeni su kao negativni „NEG.“ (nema Ct vrijednosti). Uzorak imena „EBV 68“ analiziran je dva puta zbog različitih rezultata dobivenih primjenom dvaju testova te je označen crvenom bojom.

UZORAK	VIREMIJA- <i>LightCycler 2.0</i>	Ct VRIJEDNOST	VIREMIJA- <i>LightCycler 480 II</i>	Ct VRIJEDNOST
EBV 1	28700	33,24	4800	32,55
EBV 2-5	NEG.	/	NEG.	/
EBV 6	30100	33,15	2700	33,61
EBV 7	566000000	17,5	308000000	16,1
EBV 8	176000	30,72	400000	26,96
EBV 9	112000	31,52	186000	28,09
EBV 10	40800	31,63	21900	31,25
EBV 11	893000	28,35	928000	25,72
EBV 12	400000	29,09	396000	26,98
EBV 13	145000	31,13	17700	31,57
EBV 14	151000	30,36	237000	27,73
EBV 15	7540000	24,6	7230000	22,68
EBV 16	NEG.	/	NEG.	/
EBV 17	NEG.	/	NEG.	/
EBV 18	96600	32,08	4100	31,68
EBV 19	169000	29,61	415000	24,84
EBV 20	11900	33,08	4600	31,5
EBV 21	13400	31,93	1600	33,27
EBV 22	128000	29,83	1900	33,91
EBV 23	696000	33,25	81500	27,24
EBV 24-31	NEG.	/	NEG.	/

EBV 32	181000	30,51	26000	29,58
EBV 33	526000	28,69	69100	28,16
EBV 34	180000	30,51	40500	28,94
EBV 35	192000	30,89	3600	32,42
EBV 36	42900	33,52	4700	32,06
EBV 37	449000	28,95	202000	26,6
EBV 38	491000	28,89	89500	27,78
EBV 39	445000	29,06	114000	27,43
EBV 40	356000	29,86	200000	26,61
EBV 41	319000	28,76	296000	26,05
EBV 42	40100	32,65	13900	30,49
EBV 43	40000	31,96	25200	29,62
EBV 44	2600	34,26	2700	33,12
EBV 45	53800	31,73	486000	25,24
EBV 46	12100	32,57	3100	32,88
EBV 47	321000	29,72	1310000	23,78
EBV 48	1610000	26,8	3050000	22,53
EBV 49	91900	31,8	152000	26,96
EBV 50	174000	30,23	898000	24,33
EBV 51	3090	33,64	2900	32,95
EBV 52	223000	29,97	32200	29,95
EBV 53	114000	30,77	3500	32,62
EBV 54	96000	30,96	318000	25,87
EBV 55	62900	30,76	17700	30,14
EBV 56	3300	33,59	23000	29,75
EBV 57	249000	30,18	52900	28,62
EBV 58	108000	30,07	117000	27,45
EBV 59	84200	30,61	103000	27,63
EBV 60	624000	29,44	594000	25,04
EBV 61	58800	30,91	9600	31,14
EBV 62	65500	31,37	10100	31,07
EBV 63	777000	27,37	613000	25
EBV 64	164000	29,58	45900	28,83
EBV 65	79800	31,64	5000	32,12
EBV 66	38700	31,91	11300	30,91
EBV 67	58000	31,58	56000	28,53
EBV 68	NEG.	/	1700	
EBV 69-70	NEG.	/	NEG.	/
EBV 68	NEG.	/	1800	34,69
EBV 71-100	NEG.	/	NEG.	/

4.2 Statistička analiza rezultata usporedbe viremije i Ct vrijednosti u testovima kvantifikacije DNA EBV-a

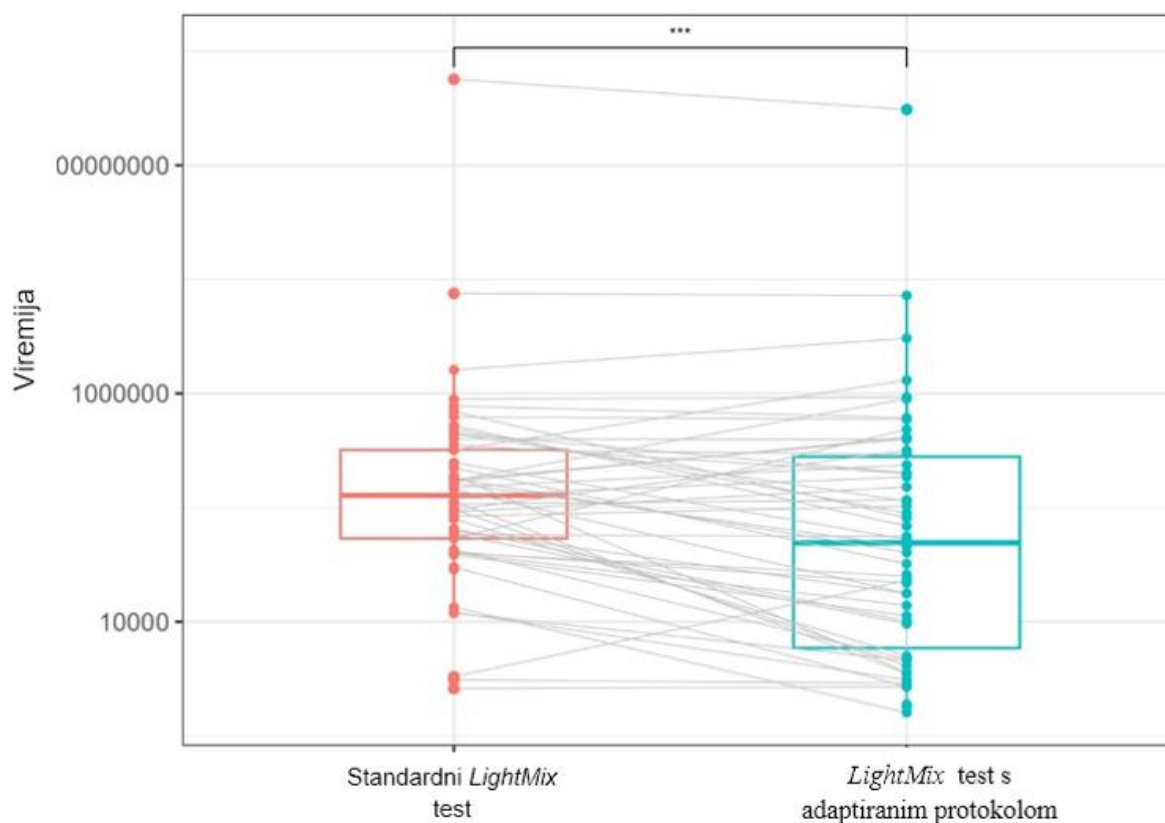
Usporedbu rezultata qPCR testova u stvarnom vremenu korištenih u ovom istraživanju započela sam analizom podudarnosti mjerljivih (pozitivni rezultati) i nemjerljivih (negativni rezultata) viremija.

Od ukupno 100 analiziranih bioloških uzoraka, 53 uzorka (53.0%) bili su pozitivni (mjerljiva viremija) uz primjenu standardnog *LightMix* testa na instrumentu *LightCycler 2.0*, dok su 54 uzorka (54.0%) bila pozitivna u *LightMix* testu s adaptiranim protokolom.

Nepodudarni tj. diskordantni rezultat dokazala sam u jednom od 100 uzoraka. Navedeni biološki uzorak je u oba testa bio nemjerljiv (negativan) na standardnom *LightMix* testu na instrumentu *LightCycler 2.0* dok je u oba testiranja koja su provedena novim testom *LightMix* s adaptiranim protokolom na instrumentu *LightCycler 480 II* viremija bila mjerljiva (1700 i 1800 kopija DNA EBV-a po ml periferne krvi). Obzirom na to da su rezultati testiranja bili podudarni u 99 od 100 uzoraka, Kohenov kappa koeficijent, koji se koristi kod analize slaganja rezultata dva testa, iznosio je 0.98. 95% interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*, CI) za ovaj Kappa koeficijent je od 0,94 do 1,00 (95% CI 0.94 - 1.00).

U svrhu usporedbe rezultata ovih molekularnih testova, detaljnije sam analizirala viremije u pozitivnim uzorcima kako bih utvrdila da li postoje razlike u broju DNA EBV-a u istim uzorcima pri korištenju različitih testova. Na Slici 11. prikazana je distribucija vrijednosti viremije kod pozitivnih uzoraka tj. uzoraka s mjerljivom viremijom dobivenih primjenom dvaju analiziranih testova. Analizom 53 uzorka koja su bila pozitivna u oba molekularna testa utvrdila sam da je u 15 uzoraka (28.3%) viremija dobivena primjenom novog *LightMix* testa s adaptiranim protokolom bila je viša u usporedbi sa rezultatima standardnog testa, dok je viremija u čak 38 uzoraka (71.7%) izmjerena standardnim testom bila viša u usporedbi s novim molekularnim testom.

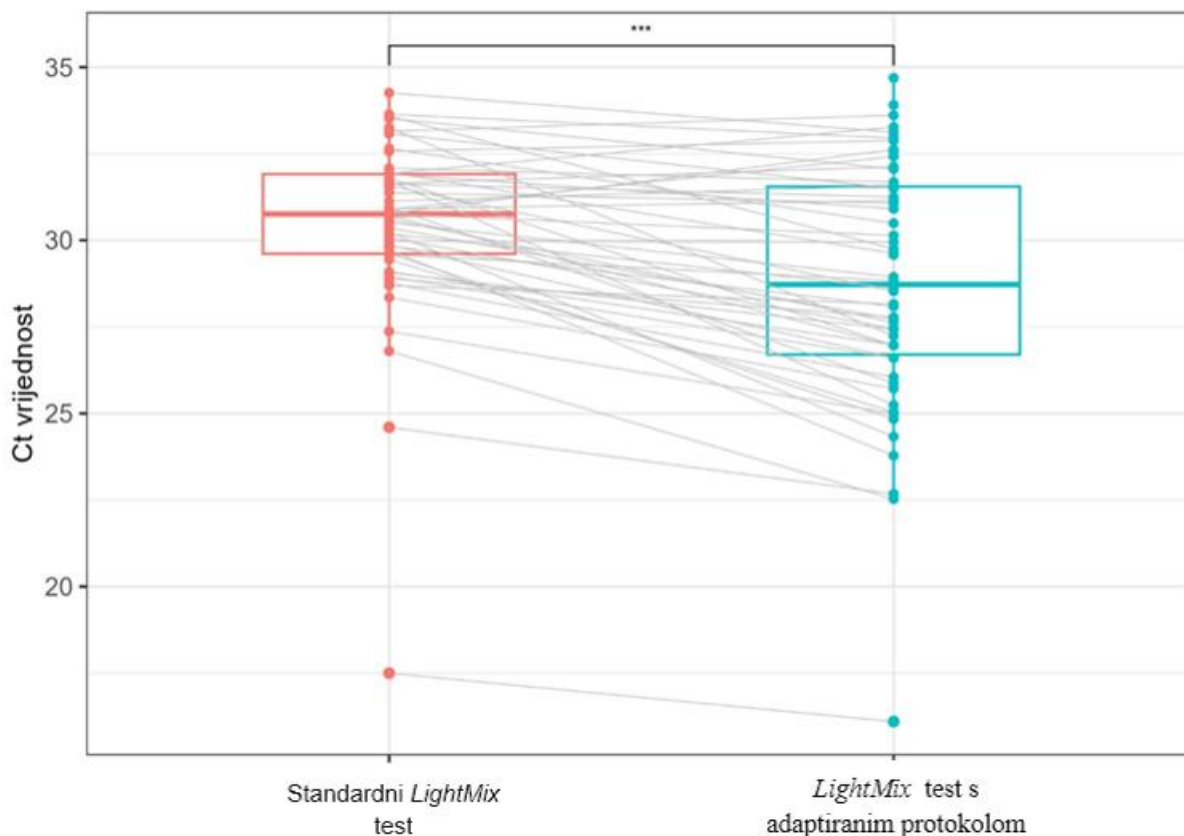
Statističkom analizom uz primjenu *Wilcoxon signed-rank test* metode utvrdila sam da je medijan viremije dobiven primjenom novog *LightMix* testa s adaptiranim protokolom iznosio 49 400 kopija DNA EBV-a po ml dok je medijan viremije dobiven standardnim testom iznosio 128 000 kopija DNA EBV-a te da je razlika u izmjerenim viremija statistički značajna ($p < 0.001$).



Slika 11. Grafički prikaz distribucije vrijednosti viremija kod pozitivnih uzoraka primjenom standardnog *LightMix* testa na instrumentu *LigthCycler 2.0* (crveno, „Standardni *LightMix* test“) i novog testa *LightMix* s adaptiranim protokolom na instrumentu *LigthCycler 480 II* (plavo, „*LightMix* test s adaptiranim protokolom“). Na x osi označeni su testovi, dok su na y osi prikazane logaritamske vrijednosti viremija. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice predstavljaju individualne uzorke, a linije predstavljaju razlike u vrijednostima između testova

Nakon usporedbe viremija dobivenih standardnim i novim testom, usporedila sam i pripadajuće Ct vrijednosti analize pojedinačnih bioloških uzoraka. Na Slici 12. prikazana je distribucija Ct vrijednosti pozitivnih uzoraka izmjerena standardnim *LightMix* testom i novim *LightMix* testom s adaptiranim protokolom.

Od ukupno 53 biološka uzorka s mjerljivom viremijom u oba testa, Ct vrijednost 9 uzoraka (17.0%) bila je viša u novom testu u odnosu na standardni test dok je u ostalim uzorcima (n=44, 83.0%) Ct vrijednosti bila viša u standardnom *LightMix* testu. Medijan Ct vrijednosti uzoraka u standardnom *LightMix* testu iznosio je 30.8 dok je u novom *LightMix* testu s adaptiranim protokolom iznosio 28.7 pri čemu je razlika bila statistički značajna ($p < 0.001$). U statističkoj analizi primijenila sam *Wilcoxon signed-rank test* koji se koristi za usporedbu distribucija dvaju numeričkih varijabli koje nisu normalno distribuirane.



Slika 12. Grafički prikaz distribucije vrijednosti Ct vrijednosti kod pozitivnih uzoraka na standardnom *LightMix* testu na instrumentu *LightCycler 2.0* (crveno, „Standardni *LightMix* test“) i novom *LightMix* testu s adaptiranim protokolom na instrumentu *LightCycler 480 II* (plavo, „*LightMix* test s adaptiranim protokolom“). Na x osi označeni su testovi, dok su na y osi označene Ct vrijednosti. Horizontalna crna linija predstavlja medijan raspodjele, dok se pravokutnici protežu od prvog do trećeg kvartila raspodjele. Točkice predstavljaju individualne uzorke, a linije predstavljaju razlike u vrijednostima između testova.

U ovom sam istraživanju također analizirala podatke o spolu, dobi i uputnoj dijagnozi ukupno 62 ispitanika čiji su biološki uzorci bili uključeni u ovo istraživanje. Aritmetička sredina dobi ispitanika iznosila je 34.7 godina (raspon od 3-71 godina) pri čemu je 36% ispitanika bilo muškog spola.

Većina ispitanika uključena je u istraživanje zbog vrućice nepoznatog podrijetla tj. etiologije (11 ispitanika), infektivne mononukleoze (4 ispitanika) i transplantacije (6 ispitanika) dok su u ostalih ispitanika utvrđene druge virusne infekcije (npr. infekcija virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1 i virusa hepatitisa C) kao i brojne autoimune bolesti (demijelinizirajuće bolesti središnjega živčanog sustava, sistemski lupus eritematozus, Sjögrenov sindrom i dr.).

5. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja pokazali su statistički značajne razlike u broju kopija DNA EBV-a i Ct vrijednosti u perifernoj krvi koje su dobivene primjenom standardiziranih qPCR testova u stvarnom vremenu *LightMix* na instrumentu *LightCycler 2.0* i *LightMix* s adaptiranim protokolom na instrumentu *LightCycler 480 II* kao i postojanje nepodudarnih rezultata testiranja. Oba testa temelje se na umnožavanju identične ciljne sekvence u genu *EBNA-2* te imaju identičnu deklariranu granicu detekcije i raspon kvantifikacije DNA EBV-a. Rezultati ovog istraživanja prvi su dostupni podatci o usporedbi rezultata kvantifikacije DNA EBV-a navedenim standardiziranim molekularnim testovima.

Literaturni podatci o usporedbi rezultata kvantifikacije DNA EBV-a u perifernoj krvi ili plazmi ispitanika primjenom standardiziranih molekularnih testova različitih proizvođača u brojnim modelima biomedicinskih istraživanja iznimno su heterogeni te ukazuju na postojanje značajnih razlika u viremiji obzirom na test.

Stelzl i sur. (2023) uspoređivali su novi standardizirani molekularni qPCR test u stvarnom vremenu *Cobas EBV test* koji je bio u ranoj fazi analitičke validacije s četiri qPCR testa koji su prethodno bili korišteni u brojnim biomedicinskim istraživanjima kao i u dijagnostici: *EBV R-GENE® kit*, *artus EBV RG PCR Kit*, *RealStar® EBV PCR Kit 2.0* te *RealTime EBV assay*. Usporedba rezultata ovih testova napravljena je primjenom referentnog pripravka DNA EBV-a Svjetske zdravstvene organizacije uz razrjeđenja kao i analizom uzoraka plazme anonimiziranih osoba. Rezultati kvantifikacije DNA EBV-a primjenom testa *Cobas EBV test* pokazali su odstupanje od $-0.0097 \log_{10}$ u odnosu na ciljnu vrijednost standardnog pripravka dok su odstupanja drugih testova analiziranih u ovom istraživanju bila u rasponu od 0.0037 i $-0.12 \log_{10}$ DNA EBV-a. Rezultati usporedbe ovih molekularnih testova pri analizi uzoraka plazme pokazala su manja odstupanja koja su bila unutar $-0.5 \log_{10}$ pri čemu je potrebno istaknuti da je analiza izrađena na modelu plazme, a ne periferne krvi (poput ovog istraživanja) te direktna usporedba s našim rezultatima nije moguća.

Zanimljivo je istaknuti da je u ovom istraživanju od ukupno 30 pozitivnih bioloških uzoraka u kojima je DNA EBV-a bila mjerljiva, primjenom *Cobas EBV test* DNA EBV-a uspješno kvantificirana u 28 uzoraka, odnosno u 27 uzoraka primjenom *RealTime EBV* i *RealStar EBV PCR Kit 2.0* testova. Korištenjem *artus EBV RG PCR Kit* testa viremija je određena u 25 uzoraka, dok je korištenjem *EBV R-GENE* testa dobiveno samo 15 mjerljivih rezultata. Ovakvi rezultati pokazuju veće neslaganje među testovima te ne ukazuju na visoku vjerodostojnost testova analiziranih u ovome istraživanju. Naime, analitički rasponi detekcije i kvantifikacije DNA EBV-a u molekularnim testovima koji su analizirani u ovom radu bili su značajno različiti: *Cobas EBV test* EBV $35-1,0 \times 10^8$ IU/ml, *R-GENE® kit* $5,0 \times 10^2-1,0 \times 10^7$ IU/ml, *artus EBV RG PCR Kit* nije definiran, *RealStar® EBV PCR Kit 2.0* $10-1,0 \times 10^8$ i *RealTime EBV assay* $40-2,0 \times 10^8$ IU/ml, odnosno za jedan test nije bio definiran. Stoga je konzistentna usporedba viremija izmjerenih u biološkim uzorcima plazme bila otežana.

Statističkom analizom naših rezultata dobiven je Cohenov Kappa koeficijent koji iznosi 0,98, što upućuje na izuzetno velik stupanj slaganja između dva analizirana testa. Također, 95% interval pouzdanja (CI) za ovaj Kappa koeficijent je od 0,94 do 1,00. To sugerira da, s 95% sigurnosti, prava vrijednost Cohenovog Kappa koeficijenta u ovom istraživanom uzorku leži između 0,94 i 1,00. Odnosno, vrlo visoko slaganje (0,98) je unutar ovog intervala. Hardin i sur. (2022) analizirali su analitičke parametre novog qPCR testa *NeuMoDx* s testom koji je prethodno korišten u brojnim biomedicinskim istraživanjima *Altona EBV DNA test*. Od ukupno 245 analiziranih uzoraka, čak 11 rezultata bilo je nepodudarno u odabranim testovima iz čega slijedi niži stupanj slaganja između ova dva testa (95.5%) u usporedbi s testovima koji su analizirani u ovom istraživanju. Obzirom na to da su *LightMix* i *LightMix* test s adaptiranim protokolom za kvantifikaciju DNA EBV-a koji su uključeni u naše istraživanje bili izvedeni uz primjenu instrumenata istog proizvođača, no druge generacije (*LightCycler 2.0* i *LightCycler 480 II*), viši stupanj podudarnosti između dva molekularna testa kojeg smo opazili u našem istraživanju u usporedbi s istraživanjem Herdina i sur. (2022) je očekivan. Iz toga zaključujemo da pri prestanku primjene određenog molekularnog testa te potrebe primjene novih generacija testova, izbor testova drugih proizvođača koji se izvode na drugim instrumentima za PCR u stvarnom vremenu može uzrokovati značajniji stupanj neslaganja s dotadašnjim rezultatima kvantifikacije DNA EBV-a.

U istraživanju Vancutsem i sur. (2023) analizirane su analitičke karakteristike testa *AltoStar® EBV PCR Kit 1.5* za kvantifikaciju DNA EBV-a u perifernoj krvi, u usporedbi sa standardiziranim testom *RealTime EBV assay* koji je prethodno korišten u biomedicinskim istraživanjima i dijagnostici. Donja granica detekcije testa *AltoStar® EBV PCR Kit 1.5* određena je usporedbom s testom *RealTime EBV assay* koji je prethodno validiran usporedbom sa standardnim pripravkom DNA EBV-a Svjetske zdravstvene organizacije (WHO NISBC 09/260 international standard) i iznosila je 148 IU/ml dok je područje linearne kvantifikacije bilo u rasponu od 375 do 500 000 IU/ml. Uz to, dokazana je podudarnost rezultata između NISBC standardnih pripravaka i rezultata testa *AltoStar EBV PCR kit 1.5* u rasponu od 2.2 do 9.6%. Visoki postotak nepodudarnosti u viremijama koje su dobivene primjenom ovih testova pokazuje da nije moguće istovremeno koristiti oba testa za longitudinalno praćenje kinetike virusne replikacije već je zbog visokog stupnja varijacije obvezno koristiti uvijek identičan qPCR test u stvarnom vremenu. Ukupno 22 biološka uzorka analizirana su u kontekstu kvantifikacije DNA EBV-a (zbog razlika u linearnom rasponu kvantifikacije ovih testova), te je dokazan visok stupanj podudarnosti. Obzirom na tako mali broj uzoraka koji su analizirani u području linearnosti ovih testova, za sada nije moguće pouzdano zaključiti jesu li rezultati kvantifikacije DNA EBV-a dobiveni ovim testovima usporedivi ili ne (Vancutsem i sur. 2023).

U ovom su radu dokazane značajne razlike u viremiji mjerenoj odabranim molekularnim testovima pri čemu je broj kopija DNA EBV-a bio veći u većini uzoraka (71.7%) u standardnom testu (*LightMix* na instrumentu *LightCycler 2.0*) u usporedbi s novim testom (*LightMix* s adaptiranim protokolom na instrumentu *LightCycler 480 II*), a sličan trend je dokazan i za razlike u Ct vrijednostima. Detaljnijom analizom rezultata utvrdila sam da su primjenom novog testa na instrumentu *LightCycler 480 II* dobivene niže razine viremije u uzorcima s visokom koncentracijom DNA EBV-a, dok je u većini uzoraka s manjom koncentracijom DNA EBV-a

dokazana viša viremija u usporedbi sa standardnim testom. Navedeni rezultat vrlo vjerojatno pokazuje da usprkos značajno nižim viremijama koje su dokazane primjenom novog testa u usporedbi sa standardnim testom analizom kompletnog seta podataka o svim biološkim uzorcima uključenim u istraživanje, test *LightMix* s adaptiranim protokolom na instrumentu *LightCycler 480 II* daje veće viremije u usporedbi sa standardnim testom u uzorcima s niskim viremijama te je za te uzorke osjetljiviji. U tom kontekstu sam interpretirala i nepodudarni (diskordantni) rezultat jednog uzorka (EBV 68) kojeg sam opisala u ovom radu pri čemu je viremija u tom uzorku izmjerena novim testom (uzorak je bio negativan u standardnom testu) bila manja od 2 000 kopija/ml.

Herdin i sur. (2022) su u svom istraživanju također analizirali podudarnost pojedinih uzoraka u odabranim testovima te otkrili 4 uzorka (1,6%) koji su bili pozitivni korištenjem *Altona EBV* testa, ali negativni na *NeuMoDx* platformi, dok je čak 12 uzoraka (4,9%) imalo mjerljivu viremiju na platformi *NeuMoDx*, no za razliku od *Altona* testa, ti mjerljivi rezultati bili su ispod vrijednosti na kojoj bi ih smatrali pozitivnima. U radu je posebno istaknut jedan uzorak (0,4%) u kojem je viremija bila mjerljiva *NeuMoDx* testom, no rezultat testa *Altona EBV* testa bio je negativan. Iako su ukupni rezultati istraživanja novog testa *NeuMoDx* za kvantifikaciju DNA EBV-a pokazali visoki stupanj podudarnosti sa standardnim testom (*Altona EBV* test), potrebno je istaknuti da je i u ovom istraživanju dokazan diskordantni rezultat što se podudara s rezultatom našeg istraživanja na dva drugačija PCR testa u stvarnom vremenu. Iz navedenog možemo zaključiti da se u području kvantifikacije DNA EBV-a može očekivati varijabilnost u rezultatima standardiziranih testova kao i diskordantni rezultati.

Obzirom na to da literaturni podatci pokazuju značajne razlike u granici detekcije kao i u kvantifikaciji DNA EBV-a različitim molekularnim testovima, razvijen je i test koji koristi dva para početnica tj. ima dvije ciljne regije u genima *EBNA1* i *BMRF2* (Lütgehetmann i sur., 2023) kako bi se osigurao bolji obuhvat svih genotipova i varijanti virusa EBV. Prvi rezultati kvantifikacije DNA EBV-a ovim testom pokazali su da je usporedbom novog testa i standardnog testat *Abbott RealTime EBV assay* koji se već godinama koristi u biomedicinskim istraživanjima na 126 biološka uzorka pokazan visok stupanj korelacije ($R^2=0.96$, aritmetička sredina razlike u rezultatima viremije od $0.1 \log_{10}$) što ukazuje na potrebu razvoja testova s više ciljnih struktura u budućnosti.

Rezultati našeg istraživanja kao i literaturni podatci nedvojbeno ukazuju na iznimno visoku varijabilnost u rezultatima kvantifikacije DNA EBV-a dobivenih primjenom qPCR testova u stvarnom vremenu te ukazuju na obvezno korištenje identičnog molekularnog testa u longitudinalnom praćenju kinetike virusne replikacije u biomedicinskim istraživanjima.

6. Zaključak

Rezultati usporedbe broja kopija DNA EBV-a u perifernoj krvi i Ct vrijednosti dobivenih primjenom dvaju standardiziranih qPCR testova u stvarnom vremenu pokazali su statistički značajne razlike kao i postojanje nepodudarnih rezultata. Pri tome je potrebno istaknuti da se radi o standardiziranim testovima u kojima se umnožavaju identične ciljne sekvence te da su deklarirane granice detekcije i rasponi kvantifikacije DNA EBV-a jednaki. Stoga zaključujemo da se praćenje kinetike replikacije virusa EBV u biomedicinskim istraživanjima obvezno mora temeljiti na primjeni identičnog standardiziranog molekularnog testa u potpunom istraživanju te da rezultati između dostupnih standardiziranih testova nisu ekvivalentni. Također zaključujemo da je biološku značajnost u kliničkom kontekstu mogućih razlika u rezultatima DNA EBV-a u identičnim uzorcima dobivenih različitim molekularnim testovima potrebno obvezno interpretirati u kontekstu literaturnih podataka o usporedivosti odabranih testova, to jest uzeti u obzir nemogućnost potpuno validne usporedbe različitih molekularnih testova.

7. Literatura

1. Alberti A, Stocker G, Lordick F, Hacker UT, Kobitzsch B, Haffner I, Baiocchi GL, Zamparini M, Tiberio GAM, Baronchelli C, Caruso A, Bossi P, Berruti A. (2023): Plasma EBV DNA as a prognostic factor in EBV associated gastric cancer: a multicenter, prospective study (EBV PRESAGE study). **Front Oncol.** 24 (13):1276138
2. Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Barrell, B. G. (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein—Barr virus genome. **Nature.** 310(5974):207–211.
3. Bite size Bio <https://bitesizebio.com/24894/4-easy-steps-to-analyze-your-qpcr-data-using-double-delta-ct-analysis/> (Pristupljeno 05.01.2024)
4. Bjernevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. (2022): Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. **Science.** 375 (6578):296-301.
5. Epstein, A. (2012): Burkitt lymphoma and the discovery of Epstein-Barr virus. **British Journal of Haematology.** 156(6): 777–779.
6. Esau, D. (2017): Viral Causes of Lymphoma: The History of Epstein-Barr Virus and Human T-Lymphotropic Virus 1. **Virology: Research and Treatment.** 8:1-5
7. Hammerschmidt, W. (2015): The Epigenetic Life Cycle of Epstein–Barr Virus. **Epstein Barr Virus** (1): 103–117.
8. Hayden, R. T., Hokanson, K. M., Pounds, S. B., Bankowski, M. J., Belzer, S. W., Carr, J., ... & Balfour Jr, H. H. (2008): Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. **Journal of clinical microbiology.** 46(1): 157-163.
9. Herdina, A. N., Ratzinger, F., Breuer, M., Schellnegger, J., Chen, R. Q., Watkins-Riedel, T., ... i Strassl, R. (2022): Performance evaluation of the fully automated NeuMoDx RT-PCR platform for the quantification of CMV and EBV DNA in EDTA plasma: implications for clinical management and establishment of a conversion formula. **Microbiology Spectrum,** 10(6).
10. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992): Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. **Bio/Technology.** 10(4): 413–417.
11. Huh, H. J., Eun, P. J., Kim, J. Y., Yun, S., Lee, M. K., Lee, N. Y., ... & Ki, C. S. (2017): Performance of the Real-Q EBV quantification kit for epstein-barr virus DNA quantification in whole blood. **Annals of Laboratory Medicine.** 37(2):147-150.
12. International Committee on Taxonomy of Viruses 2022 <https://ictv.global/> (Pristupljeno 20.09.2023)
13. Kang, M. S., & Kieff, E. (2015): Epstein–Barr virus latent genes. **Experimental & molecular medicine,** 47(1)
14. Kralik, P., & Ricchi, M. (2017):A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. **Frontiers in Microbiology.** 8.

15. Lay, M. L. J., Lucas, R. M., Ratnamohan, M., Taylor, J., Ponsonby, A. L., Dwyer, D. E., & Ausimmune Investigator Group (AIG). (2010): Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. **Virology journal**. 7: 1-11.
16. Lütgehetmann, M., Albert, E., Hamilton, A., Jarem, D., Pfefferle, S., Stucki, H., i Navarro, D. (2023): Evaluation of a quantitative dual-target EBV DNA test on a fully automated molecular testing system. **Journal of Clinical Microbiology**, 61(8).
17. Murata, T. (2018):Encyclopedia of EBV-Encoded Lytic Genes: An Update. **Human Herpesviruses**. 395–412.
18. Murata, T., & Tsurumi, T. (2013): Switching of EBV cycles between latent and lytic states. **Reviews in Medical Virology**. 24(3): 142–153.
19. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015): Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**. 439: 231–250.
20. Nowalk A, Green M (2016): Epstein-Barr Virus. **Microbiol Spectr**. 4(3).
21. Patel P D, Alghareeb R, Hussain A, i sur. (2022): The Association of Epstein-Barr Virus With Cancer. **Cureus**. 14(6)
22. Price, A. M., & Luftig, M. A. (2014): Dynamic Epstein–Barr Virus Gene Expression on the Path to B-Cell Transformation. **Advances in Virus Research**. 279–313.
23. Rozman, M. Korać, P.; Jambrosic, K. Židovec Lepej, S. (2022): Progress in Prophylactic and Therapeutic EBV Vaccine Development Based on Molecular Characteristics of EBV Target Antigens. **Pathogens**. 11, 864
24. Soldan SS, Lieberman PM. (2023): Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. **Nat Rev Microbiol**. 21(1):51-64.
25. Stelzl, E., Kessler, H. H., Parulekar, A. D., Bier, C., Nörz, D., Schneider, T., ... & Lütgehetmann, M. (2023): Comparison of four commercial EBV DNA quantitative tests to a new test at an early stage of development. **Journal of Clinical Virology**, 161, 105400.
26. Tao Q, Young LS, Woodman CB, Murray PG. (2006): Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers--genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. **Front Biosci**. 11:2672-713.
27. Thermo Fisher Scientific <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html> (Pristupljeno 05.01.2024)
28. Vancutsem E, Crombé F, Soetens O, Wautier M, Dördelmann C, Piérard D, Wybo I, Demuyser T. (2024): Evaluation of two automated real-time PCR-based quantification methods for whole blood Epstein-Barr viral load. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 108(2):116101
29. Young LS, Arrand JR, Murray PG.(2007): EBV gene expression and regulation. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. **Cambridge: Cambridge University Press**. (27).
30. Židovec Lepej, S., Matulić, M., Gršković, P., Pavlica, M., Radmanić, L., & Korać, P. (2020): miRNAs: EBV mechanism for escaping host’s immune response and supporting tumorigenesis. **Pathogens**. 9(5): 353.

Životopis

Rođena sam 30.05.2000. godine u Splitu gdje sam i završila I. jezičnu gimnaziju. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja bavila sam se izvannastavnim aktivnostima kao što su debatni klub, fotoklub te sudjelovala na filozofskom simpoziju Franjo Petrić. Upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije na prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2018.godine te ga završila 2021.godine kada sam na istom fakultetu upisala Sveučilišni diplomski studij Molekularne biologija. Tijekom studiranja bila sam članom Udruge studenata biologije BIUS, a 2022.godine odradila sam laboratorijsku stručnu praksu pri Klinici za infektivne bolesti “dr. Fran Mihaljević”. Za vrijeme treće godine preddiplomskog studija primala sam državnu stipendiju u STEM područjima znanosti, dok sam na diplomskome studiju primala stipendiju Grada Splita. Od stranih jezika tečno pričam engleski jezik, a na razgovornoj razini pričam i talijanski te španjolski jezik.