

Molekularna dijagnostika infekcije virusom humane imunodeficijencije tipa 1

Kobak, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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:217:372142>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lidija Kobak

Molekularna dijagnostika infekcije virusom humane
imunodeficijencije tipa 1

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad, izrađen u Odjelu za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku Klinike za zarazne bolesti “Dr. Fran Mihaljević”, pod vodstvom Dr.sc. Snježane Židovec Lepej, više znanstvene suradnice, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Neizmjerne se zahvaljujem svojoj mentorici Dr. sc. Snježani Židovec Lepej na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Profesorici dr.sc. Gordani Lacković-Venturin najljepše hvala na susretljivosti, stručnim savjetima i razumijevanju.

Svim članovima Odjela za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku zahvaljujem na pomoći i vremenu.

Lidija

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna dijagnostika infekcije virusom humane imunodeficijencije tipa 1

Lidija Kobak

Biološki odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Hrvatska

Određivanje broja kopija RNA virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) u plazmi (viremija) ukazuje na kinetiku virusne replikacije u zaraženih osoba i korisiti se u dijagnostičkoj obradi bolesnika. Cilj ovog rada bio je odrediti broj kopija HIV-1 RNA u plazmi zaraženih osoba primjenom dvaju standardiziranih molekularnih metoda i usporediti dobivene rezultate kako bi se odredila sukladnost metoda. COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™, verzija 1.5 test se temelji na principu klasičnog PCR-a i predstavlja standardnu metodu u kliničkim laboratorijima. Novi COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 test se temelji na principu PCR-a u realnom vremenu a dostupan je od 2008.g. Viremija je određena u uzorcima plazme 64 ispitanika. Viremija u klasičnom PCR testu (medijan 4.2 log₁₀ kopija/ml) bila je statistički značajno veća u usporedbi s viremijom u PCR-testu u realnom vremenu (medijan 3.73 log₁₀ kopija/ml). Koeficijent korelacije klasičnog PCR-a i PCR-a u realnom vremenu iznosio je samo 0.74. Od 64 uzorka, u čak 23 uzorka razlika logaritama viremije bila je veća od 0.5 log₁₀ kopija/ml plazme što se smatra analitički značajnom razlikom. Rezultati ovog rada pokazali su da novi PCR test u realnom vremenu analitički podcjenjuje broj kopija HIV-1 RNA u plazmi te da rezultati novog testa nisu usporedivi sa standardnim klasičnim PCR testom.

(38 stranica, 11 slika, 2 tablice, 42 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u biblioteci na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, Rooseveltov trg 6

Ključne riječi: HIV-1 RNA, klasični PCR, PCR u realnom vremenu

Voditelj: Dr. sc. Snježana Židovec Lepej, viši znanstveni suradnik
Suvoditelj: Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, redovni profesor

Ocjenitelji: Dr. sc. Snježana Židovec Lepej, viši znanstveni suradnik
Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, redovni profesor
Dr. sc. Nada Oršolić, redovni profesor
Dr.sc. Željka Vidaković-Cifrek, docent

Rad prihvaćen: 03.06.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Molecular diagnostics of human immunodeficiency virus type 1 infection

Lidija Kobak

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb,
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) copy number in plasma (viral load) is essential to monitor the kinetics of the viral replication in infected individuals and is used in clinical diagnostics.

The object of this study was to determine the number of HIV-1 copies in plasma of infected individuals using two standard molecular assays and to compare the results in order to evaluate compatibility of these assays. The COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™], version 1.5 Test is standard assay used in clinical laboratories and is based on the traditional PCR technology. The new COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 test is based on the technology of the real-time PCR and is available since 2008. Viral load was measured in plasma samples of 64 HIV-1 infected individuals. Viral load measured with traditional PCR (mean 4.2 log₁₀ copy/ml) showed greater statistical discrepancies compared to viral load from real-time PCR (mean 3.73 log₁₀ copy/ml). The correlation coefficient of the assays was only 0.74. Out of 64 samples, 23 gave results with variances greater than 5 log₁₀ copy/ml plasma, which is our clinical cutoff. The results of this study showed that the new real-time PCR assay analytically undermines the number of HIV-1 RNA copies in plasma and that its results cannot be compared to the results of the traditional PCR.

(38 pages, 11 figures, 2 tables, 42 references, original in Croatian language)

Thesis is deposited in the library at the Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

Keywords: HIV-1 RNA, PCR, real-time PCR

Supervisor: Dr.sc. Snježana Židovec Lepej, assistant research scientist

Co-supervisor: Dr.sc. Gordana Lacković-Venturin, professor

Reviewers: Dr. Snježana Židovec Lepej, assistant research scientist

Dr. Gordana Lacković-Venturin, professor

Dr. Nada Oršolić, professor

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, assistant professor

Thesis accepted: 03.06.2009.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1 Virus humane imunodeficijencije	1
1.1.1. Imunopatogeneza HIV infekcije	4
1.1.2. Liječenje HIV infekcije	6
1.2. Lančana reakcija polimeraze	7
1.2.1. PCR reakcija	8
1.2.2. Lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom	10
1.3. Detekcija produkta klasičnim PCR-om	11
1.4. PCR u realnom vremenu	12
1.5. Kvantifikacija PCR produkta	15
2. MATERIJALI I METODE	16
2.1. Ispitanici	16
2.2. Biološki uzorci	16
2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	16
2.3.1. COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v. 1.5..	17
2.3.2. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test.....	18
2.4. Statističke metode	19
2.5. Reagencije i otopine	20
2.5.1. COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v. 1.5..	20
2.5.2. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test.....	22
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	25
4. REZULTATI	26
5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČAK	33
7. LITERATURA	34

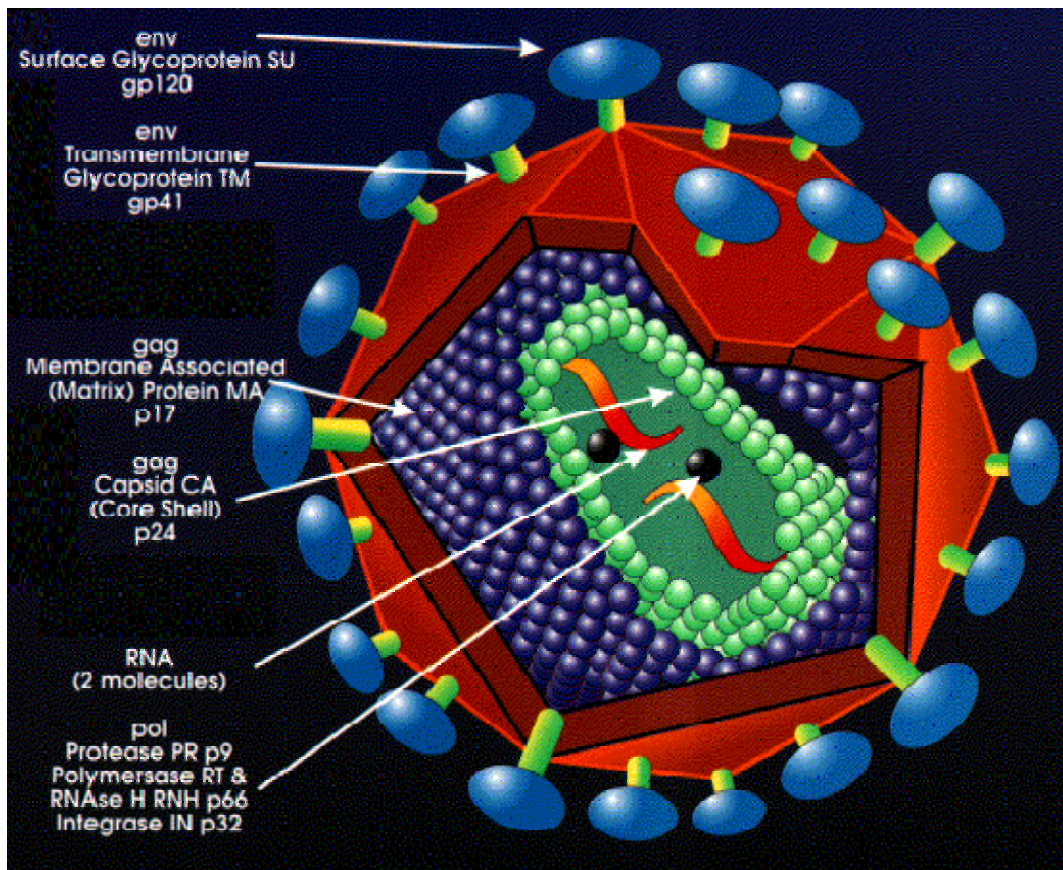
1. UVOD

1.1 Virus humane imunodeficijencije

Virus humane imunodeficijencije (HIV, eng. human immunodeficiency virus) je retrovirus (*Retroviridae*) iz potporodice lentivirusa (*Lentivirinae*). Istraživanja molekularne evolucije HIV-a pokazala su da se podrijetlo HIV-a veže uz područje subsaharske Afrike.

Jedno od temeljnih bioloških obilježja HIV-a je velika molekularna heterogenost. Temeljem aminokiselinske sekvence, HIV se klasificira u tipove, grupe i subtipove. Razlikujemo dva glavna tipa ovog virusa, HIV-1 i HIV-2. Oba tipa virusa prenose se spolnim odnosima, putem krvi i vertikalnim prijenosom (sa zaražene majke na dijete) te mogu uzrokovati sindrom stečene imunodeficijencije (eng. acquired immunodeficiency syndrome ili AIDS). HIV-1 je dominantan i odgovoran za globalnu pandemiju, dok HIV-2 nema virulentni potencijal HIV-1 tipa i uglavnom je ograničen na područja centralne i zapadne Afrike.

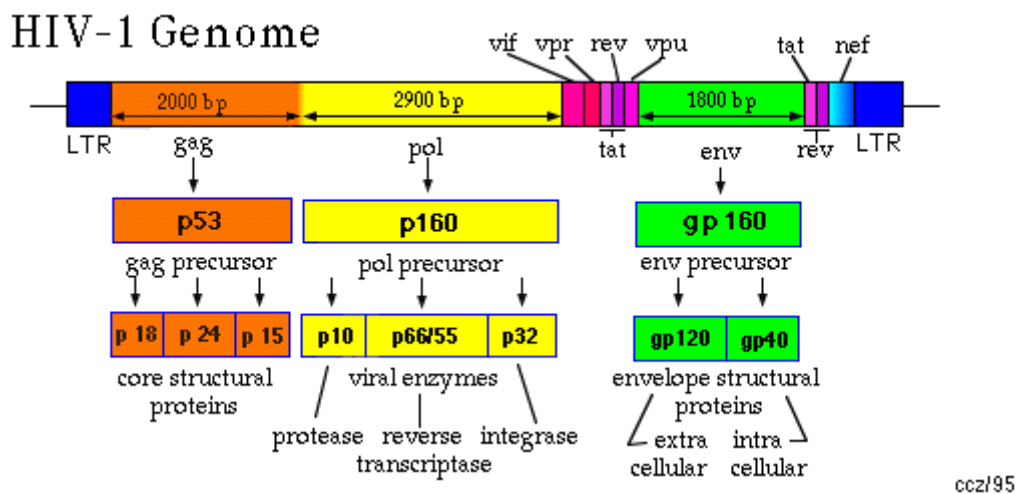
Sojevi HIV-1 tipa klasificiraju se u tri filogenetski srodne grupe: grupa M (major), grupa O (outlier) i grupa N (non-M, non-O) (Robertson, 2000). Preko 90% HIV-1 zaraza ubraja se u grupu M, dok su grupe O i N uglavnom ograničene na središnju i zapadnu Afriku. U grupu M ubraja se devet sekvencijski subtipova HIV-a tipa 1 (A, B, C, D, F, G, H, J, K) koji iskazuju međusobnu homologiju od 25-30% (McCutchan, 2000). Rekombinacijom dvaju subtipova koji zaražavaju istu stanicu nastaju i rekombinirani sojevi koje CRF sojevima (circulating recombinant forms).



Slika 1: Virion HIV-a (preuzeto s <http://www.yale.edu/bio243/HIV/hivstructure.html>)

Virion HIV-a sastoji se od nukleoproteinske jezgre okružene dvoslojnom lipidnom ovojnicom koja sadrži površinske (gp120) i transmembranske (gp41) *env* proteine. Nukleoproteinska jezgra sadrži dvije kopije jednolančane RNA pozitivnog polariteta duge 9749 nukleotida (Rather, 1985) kao i poseban enzim, reverznu transkriptazu (RT; DNA-polimerazu ovisnu o RNA) koja stvara dvolančanu DNA kopiju virusne RNA. Provirusna DNA formira HIV-1 genom koji se sastoji od oko 9.8 kilobaza kodiranih proteinskih informacija omeđenih s po jednom sekvencom LTR-a (eng. long terminal repeat) (Muesing, 1985). Geni HIV-a nalaze se unutar centralne regije provirusne DNA i kodiraju najmanje 9 proteina koji su podijeljeni u tri razreda: 1) glavni strukturni proteini Gag, Pol i Env, 2) regulacijski proteini Tat i Rev i 3) dodatni proteini Vpu, Vpr, Vif i Nef (Gallo, 1988). *Gag* kodira za grupu specifičnih antigena, protein p24 (24 kilodaltona) koji izgrađuje viralnu kapsidu, p6 i p7 koji izgrađuju nukleokapsidu, i protein matriksa p17 (Freed, 1998). *Pol* kodira za virusne enzime: reverznu transkriptazu, proteazu, ribonukleazu i integrazu.

Površinski i transmembranski proteini ovojnice kodirani su *env* genom. *Tat* (engl. trans-activator of transcription) kodira za protein koji povećava brzinu transkripcije i ima glavnu ulogu u izbjegavanju nadzora imunološkog sustava domaćina jer djeluje i kao virusni toksin potičući apoptozu naivnih T-limfocita. *Rev* (engl. regulator of virion) kodira za protein koji se veže na virusnu RNA i omogućuje joj transport u citoplazmu. *Nef* (engl. negative regulating factor) pomaže u preživljavanju inficiranih stanica tako što sprečava ekspresiju MHC II molekula. *Vif* i *Vpr* proteini važni su u viralnoj replikaciji, a *Vpu* za pupanje virusnih čestica i izlazak iz stanice.



Slika 2: HIV-1 genom (preuzeto s <http://www.yale.edu/bio243/HIV/genome.html>)

HIV inficira CD⁺ limfocite T, makrofage i dendritičke stanice, odnosno sve stanice koje na površini nose CD4 receptor. Virus koristi dva receptora za ulazak u stanicu: primarni receptor molekulu CD4 i koreceptor tj. jedan od staničnih receptora za kemokine. In vivo, najvažniji kemokinski koreceptori za HIV su CCR5 i CXCR4 a valja naglasiti da različiti sojevi koriste različite kemokinske receptore (Simmons, 2000). Prvi korak u umnožavanju HIV-a je vezanje virusnih proteina gp120 i poslije gp41 sa receptorom CD4 i kemokinskim koreceptorima (Wyatt, 1998). Spajanjem virusa sa receptorima dolazi do stapanja virusne ovojnice s ovojnicom stanice uz oslobađanje virusnog nukleoproteinskog kompleksa u citoplazmi (Ferguson, 2002). Reverzna transkriptaza omogućuje sintezu virusne DNA od virusne RNA. Virusna DNA zatim migrira u jezgru gdje enzim integraza omogućava ugradnju virusne DNA u kromosomsku staničnu DNA. Integrirana provirusna DNA može biti u transkripcijski aktivnom ili latentnom stanju (Cimarelli, 2002, Gottlinger, 2001).

Kada je transkripcijski aktivna, provirusna DNA transkripcijom stvara novu virusnu RNA i virusnu mRNA koja sadržava kodove za regulacijske (*tat*, *rev*) i strukturne (*gag-pol*) virusne proteine. Novonastali virusni poliproteini gena *gag-pol* i prekursor gena *gag* zajedno sa novonastalom RNA stvaraju novi virus u citoplazmi, u blizini stanične stijenke (Wilk, 2001). Pupanjem virus dobiva lipidnu ovojniciu stanice domaćina s virusnim proteinima (proizvodi gena *env*) (Campbell, 2001). U vrijeme ili odmah nakon pupanja virusna proteaza cijepa *gag* i *gag-pol* prekursorske proteine stvarajući nove zrele zarazne virusne čestice (Freed, 1998).

1.1.1. Imunopatogeneza HIV infekcije

Prema UNAIDS-ovom izvještaju o pandemiji AIDS-a za 2007. godinu, u svijetu živi oko 33 milijuna ljudi zaraženih HIV-om (UNAIDS, 2009). Krajem 2008. godine u Hrvatskoj je zabilježeno 732 HIV slučajeva, uključujući 289 bolesnika oboljelih od AIDS-a od kojih je 156 umrlo. U 2008. zabilježeno je 66 novih slučajeva HIV-a, 17 novih oboljelih od AIDS-a i više od 10 smrtnih slučajeva AIDS bolesnika (HZJZ, 2009).

Infekcija HIV-om uzrokuje progresivno smanjenje subpopulacije CD4+ limfocita T uz stalni porast broja kopija HIV-1 RNK po ml plazme zaraženih osoba. Stupanj imunodeficijencije zaraženih osoba određuje se kvantifikacijom broja CD4+ limfocita T u krvi a viremija pruža informacije o aktivnoj virusnoj replikaciji. Postoje četiri stadija HIV infekcije: inkubacijski period, primarna infekcija, klinička latencija i simptomatska HIV bolest (AIDS).

Inkubacijski period je obično simptomatski i traje između dva i četiri tjedna.

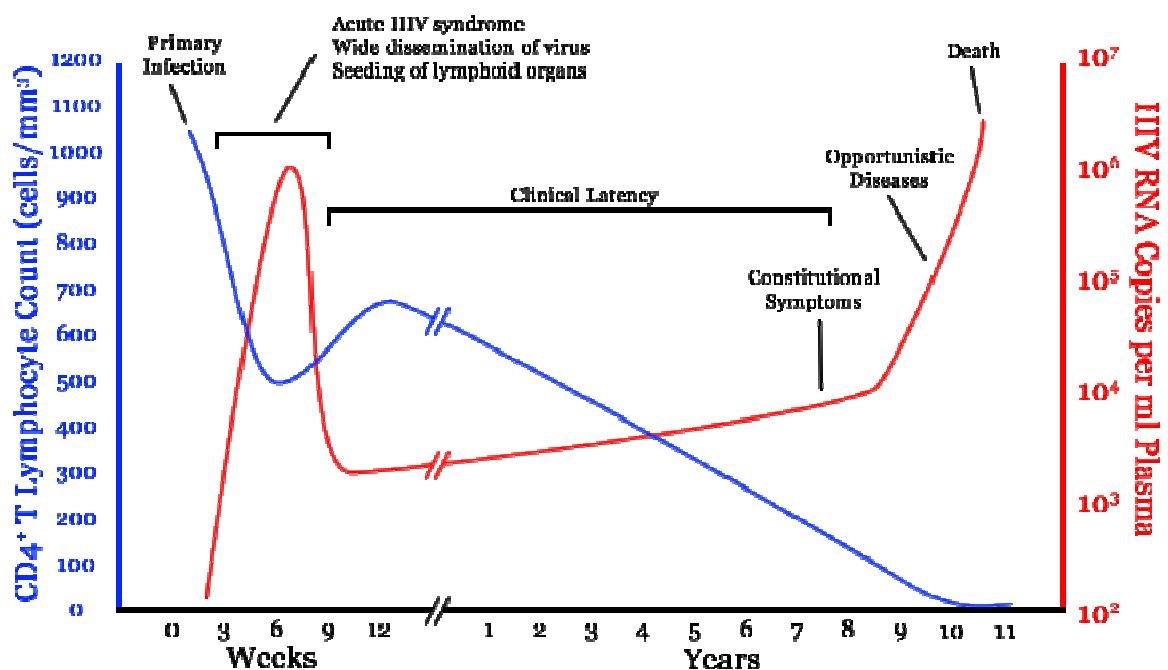
Primarna ili akutna faza HIV infekcije javlja se dva do četiri tjedna nakon zaraze virusom i traje u prosjeku 28 dana (Kahn, 1998). U tom periodu dolazi do brze replikacije virusa, pa uzorci mogu sadržavati i po nekoliko milijuna virusnih čestica po mililitru (Piatak, 1993). Dolazi do značajnog smanjenja broja CD4+ limfocita T u krvi, ali i do aktivacije CD8+ T limfocita, koje ubijaju HIV-om zaražene stanice. Simptomi većine bolesnika slični su simptomima gripe ili mononukleoze kao što su povišene temperature, mučnine, glavobolje, limfadenopatije, osipi. Upravo zbog nespecifičnosti simptoma akutna faza se često pogrešno dijagnosticira.

Dijagnoza se temelji na serološkim enzimskim imunotestovima kojima se dokazuju antitijela specifična za virus (pojavljuju se 4-12 tjedana nakon infekcije), dokazivanju HIV RNA u plazmi ili HIV DNA u stanicama, ili dokazivanju p24 antigena virusa.

Faza kliničke latencije nastupa kada snažna imunoreakcija organizma značajno smanji broj virusnih čestica u krvi. Faza može trajati između dva tjedna i dvadeset godina.

HIV je aktivan u limfoidnim organima gdje su velike količine virusa zarobljene u mreži folikularnih dendritičkih stanica (Burton, 2002).

Kada broj CD4+ T limfocita padne ispod 500 stanica po mikrolitru krvi dolazi do značajne deficijencije stanične imunosti, a imunološki sustav gubi sposobnost kontrole virusne replikacije. Tada govorimo o AIDS-u. Prvi simptomi su gubitak na težini, infekcije dišnih puteva, prostatitis, kožni osipi i oralne ulceracije, a nakon toga započinju oportunističke infekcije i tumori koji na kraju dovode do smrti pacijenta. Pri postavljanju dijagnoze AIDS-a najčešće su ove oportunističke infekcije: Pneumocystis carinii pneumonia, kriptosporidijaza, histoplazmoza i druge infekcije uzrokovane virusima, bakterijama i parazitima (HUIV, 2009).



Slika 3: Stadiji HIV imunopatogeneze (preuzeto s <http://www.journaids.org/hivaidsoverview.php>)

1.1.2. Liječenje HIV infekcije

HIV infekcija se liječi vrlo djelotvornim antiretrovirusnim liječenjem (eng. highly active antiretroviral treatment ili HAART) koje se definira kao kombinacija lijekova koja smanjuje viremiju u plazmi na manje od 50 kopija/ml plazme u prethodno neliječenih osoba. Skupine lijekova koje se koriste u liječenju su: 1. nukleozidni analozi koji inhibiraju reverznu transkriptazu virusa (NRTI), 2. nukleotidni analog koji inhibira reverznu transkriptazu, 3. nenukleozidni analozi koji inhibiraju reverznu transkriptazu (NNRTI), 4. inhibitori virusne proteaze (PI) i 5. inhibitor fuzije viriona i stanične membrane, 6. inhibitori kemokinskih koreceptora i 7. inhibitori integraze (Begovac, 2005, Schiller 2009)

Antiretrovirusni lijekovi djeluju na različite stadije životnog ciklusa virusa te onemogućuju njegovo razmnožavanje u domaćinskom organizmu. U skladu s time dolazi do smanjenja broja virusnih čestica u krvi, rekonstituiranja imunološkog sustava i odgađanja ili potpunog zaustavljanja pojava bolesti karakterističnih za AIDS (HIV/AIDS & Hepatitis C Information Website, 2009).

1.2. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (eng. polymerase chain reaction ili PCR) je metoda koja omogućava stvaranje velikog broja kopija specifične nukleotidne sekvence početnog uzorka DNA. Metodu je 1983. godine razvio Kary Mullis, koji je za to otkriće 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. PCR metoda danas je uobičajena i često nezamjenjiva tehnika u medicinskim i biološkim laboratorijima i ima primjenu u arheologiji, forenzici, testiranju očinstva, biološkim istraživanjima, kliničkoj dijagnostici i mnogim drugima (Mullis, 1994).

PCR omogućuje simulaciju prirodne DNA replikacije za gensku sekvencu po izboru, što rezultira stvaranjem kopija određene sekvence (Saiki, 1985; Mullis, 1990). Kako bi uopće došlo do DNA replikacije u procesu umnažanja, potrebno je dodati ciljnu nukleinsku kiselinu, DNA polimerazu, početnice, dNTP-ove, soli i pufere u reakcijsku smjesu.

DNA polimeraza koja se koristi u PCR-u mora biti termostabilna kako bi mogla biti aktivna raditi na visokim temperaturama PCR ciklusa. Takve polimeraze se mogu naći u bakterijama koje žive na vrućim izvorima, kao što je *Thermus aquaticus* (*Taq* polimeraza) ili mogu biti stvorene posebno za ovu funkciju, kao što je *Thermus species* DNA polimeraza (Z05) (Chien, 1976). Polimeraza ima sljedeće enzimatske aktivnosti: 5' → 3' polimeraznu aktivnost, 3' → 5' nukleaznu aktivnost i 5' → 3' nukleaznu aktivnost. Postoje i polimeraze koje su sposobne obavljati reverznu transkripciju i amplifikaciju (rekombinantni enzim *Thermus thermophilus* DNA polimeraza).

5' → 3' polimeraznu aktivnost polimeraza koristi za sintezu novih lanaca. Kako bi to bilo moguće potreban je kompleks DNA ili RNA predložka i početnica. Sinteza lanca ide uvijek u 5' → 3' smjeru.

3' → 5' nukleazna aktivnost je potrebna enzimu za lektorirajuću („proofreading“) funkciju. Naime, enzim provjerava novosintetizirani lanac i odstranjuje pogrešno ugrađene nukleotide prije nego što će nastaviti daljnju polimerizaciju. Replikacija je upravo zato točna, jer se parovi baza provjeravaju dvaput.

5' → 3' nukleaznu aktivnost se koristi za ekscizijski popravak DNA i za uklanjanje RNA početnica sa lanca koji zaostaje („lagging strand“).

Početnice (eng. primers) su mali oligonukleotidi dužine od oko dvadesetak baza specifični za ciljanu sekvencu. Dizajnirani su da bi hibridizirali sa svakim krajem ciljane regije koja će se umnožiti. U reakciju su uključene dve početnice, po jedna za svaki od komplementarnih jednolančanih DNA lanaca dobivenih u procesu denaturacije.

Početnice se vežu (eng. anneal) na ciljane lance na temperaturi između 50°C i 65°C, ovisno o dužini i sastavu baza samih početnica. Tako je omogućena visoka specifičnost vezanja, jer pri takvim temperaturama početnice ne bi mogle ostati spojene sa krivim ciljnim sekvencama. Početnice imaju slobodan 3'-OH nukleotid na kraju kojeg prepoznaje DNA polimeraza, te katalizira sintezu komplementarnog lanca.

Optimalna koncentracija početnica za PCR varira ovisno o sekvenci početnice, ciljnoj sekvenci, kompleksnosti sekvence ciljne DNA i količini ciljne DNA inicijalno prisutne u uzorku. U slučaju pretjeranih količina početnica gubi se specifičnost i povećava se vjerojatnost stvaranja „primer-dimer“ struktura.

PCR smjesa za umnažanje, osim DNA uzorka za umnažanje, DNA polimeraze i početnica, sadrži pufer i dNTP-ove. Ako se koristi Z05 polimeraza PCR pufer, uz ostale sastojke, sadrži 10 mM Tris (pH iznad 8) KCl-a i MgCl₂. Dodatak optimalne količine MgCl₂ od izuzetne je važnosti za specifičnost PCR produkta.

1.2.1. PCR reakcija

Jedan ciklus PCR-a se sastoji od tri koraka: denaturacije, vezanja početnica i produljivanja. Ti koraci se odvijaju u „thermal cycleru“, instrumentu koji automatski kontrolira i prilagođava temperaturu za programirane vremenske periode i određen broj PCR ciklusa.

1) Denaturacija

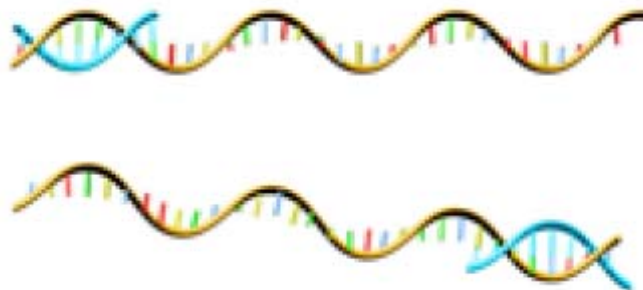
Denaturacija toplinom (većom od 90°C) razdvaja dvolančanu DNA na dva jednolančana lanca. Budući da su vodikove veze između komplementarnih baza slabe, pucaju na visokim temperaturama, a jake kovalentne veze između deoksiriboze i fosfata ostaju nedirnute.



Slika 4: Denaturacija predloška toplinom (preuzeto sa http://roche-biochem.jp/pdf/prima/molecular_biology/pcr/1.pdf)

2) *Vezanje početnica („annealing“)*

Nakon što se DNA denaturira početnice se vežu s visokom specifičnošću na sekvencu DNA lanca komplementarnu njihovoj sekvenci. Početnice određuju početnu i završnu točku novog DNA lanca koji će se sintetizirati u idućem koraku. Temperatura na kojoj se odvija vezanje početnica ovisi o dužini i GC sadržaju početnica. Općenito, temperatura od 55-65°C je temperatura vezanja za početnice od 20 nukleotidnih baza sa oko 50% GC sadržaja.



Slika 5: Vezanje početnica na kalup (preuzeto sa http://roche-biochem.jp/pdf/prima/molecular_biology/pcr/1.pdf)

3) *Produljivanje („extension“)*

Nakon što se početnice vežu na komplementarne DNA sekvence temperatura se diže na otprilike 72°C, a DNA polimeraza počinje replikaciju DNA lanca. DNA polimeraza prepoznaje mjesta gdje su početnice vezane za DNA lanac i tamo se veže. Enzim prima instrukcije od DNA predloška za sintezu komplementarnog lanca vezanjem i spajanjem komplementarnih nukleotida koji su u suvišku u reakcijskoj smjesi. Produljivanje uvijek započinje na 3' kraju početnice stvarajući dvostruki lanac iz svakog jednostrukog.

Termostabilna DNA polimeraza sintetizira isključivo u 5' → 3' smjeru, što znači da se slobodni nukleotidi dodaju na 3' kraj početnice.



Slika 6: Produljivanje početnica termostabilnom polimerazom (preuzeto sa http://roche-biochem.jp/pdf/prima/molecular_biology/pcr/1.pdf)

Na kraju prvog PCR ciklusa postoje dvije kopije ciljne sekvence. Taj dvolančani produkt PCR naziva se amplikon. Svaki novi ciklus teoretski udvostručava količinu ciljne DNA.



Slika 7: Kraj prvog ciklusa PCR-a: dvije kopije predloška (preuzeto sa http://roche-biochem.jp/pdf/prima/molecular_biology/pcr/1.pdf)

1.2.2. Lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom

Ukoliko je ciljni fragment RNA potrebno je napraviti lančanu reakciju polimeraze sa reverznom transkripcijom. Lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom prethodi klasičnom PCR-u, a odvija se u tri koraka: vezanje početnica, produljivanje lanaca polimerazom i stvaranje cDNA.

1.3. Detekcija produkta klasičnim PCR-om

Produkti dobiveni klasičnim PCR-om mogu se detektirati na različite načine.

Najjeftiniji i najrašireniji način je detekcija produkta na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Ova vrsta detekcije je isključivo kvalitativna. Produkt je potrebno obojiti (etidijev bromid, srebrov nitrat) da bi se mogao vizualizirati. Osim toga, potrebno je koristiti standardne markere kojima se određuje veličina fragmenta.

Za više specifično određivanje produkta radi se detekcija Southern blot metodom. Kod ove metode produkt detektiran na gelu prenosi se na nitroceluloznu membranu na kojoj se nalaze oligonukleotidne probe ciljne sekvence. Produkt je potrebno obilježiti (fluorescentno ili radioaktivno obilježene probe) da bi se mogao vizualizirati.

Direktna hibridizacija koristi kombinaciju PCR-a i reverzne hibridizacije. PCR se primjenjuje za umnažanje ciljnog fragmenta, a početnice koje su obilježene biotinom. Nakon PCR reakcije slijedi reverzna hibridizacija gdje se dio ciljnog fragmenta koji je umnožen hibridizira sa specifičnim oligonukleotidnim probama koje su imobilizirane na nitroceluloznoj membrani. Nakon hibridizacije i ispiranja dodaje se alkalna fosfataza konjugirana streptavidinom koja će se vezati za svaki stvoreni biotinizirani hibrid. Inkubacije s kromogenom daje obojeni talog, te tako možemo očitati rezultate.

Gore navedeni načini detekcije su isključivo kvalitativni, a jedini način kvantifikacije PCR produkta je hibridizacija umnoženih produkata na oligonukleotidne detekcijske probe i kolorimetrijska detekcija. PCR amplikon obilježen biotinom hibridizira sa specifičnom oligonukleotidnom detekcijskom probom vezanom na detekcijske magnetske čestice. Dodaje se konjugat avidin-peroksidaze iz hrena koji se veže za amplikon označen biotinom. Nevezani konjugat se ispire i dodaje se otopina koja sadrži vodikov peroksid i 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB). U prisutnosti vodikovog peroksida hren peroksidaza vezana za magnetsku česticu katalizira oksidaciju TMB-a što stvara obojeni kompleks. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 660 nm.

1.4. PCR u realnom vremenu

Princip PCR-a u realnom vremenu zasniva se na detekciji i kvantifikaciji fluorescentnog reporter signala tijekom PCR umnažanja (Lee, 1993; Livak, 1995). Količina emitirane fluorescencije proporcionalna je količini PCR produkta i omogućuje praćenje PCR umnažanja. Fluorescencija se mjeri tijekom svakog ciklusa umnažanja. Detekcija akumuliranog PCR produkta u svakom od ciklusa omogućena je kombinacijom „thermal cycling“-a, fluorescencijske detekcije i kompjuterske analize na jednom instrumentu. PCR u realnom vremenu prati linearnu fazu umnažanja u kojoj nijedna od reakcijskih komponenti nije ograničavajuća. Upravo je to preduvjet za točno izračunavanje početnog broja kopija ciljane DNK sekvence u uzorku.

Testove PCR-a u realnom vremenu karakterizira širok dinamički raspon kvantifikacije, visoka analitička osjetljivost i visoka preciznost.

Kvantitativni rezultati dostupni su odmah nakon PCR umnažanja bez dodatne purifikacije ili analize. Budući da nisu potrebni nikakvi koraci nakon samog PCR-a, smanjena se ukrižena onečišćenja PCR produkta.

PCR u realnom vremenu koristi se u dijagnostici, analizama genske ekspresije, detekciji patogena, određivanja količine bakterije ili virusa u uzorku i kod alelnog razlikovanja.

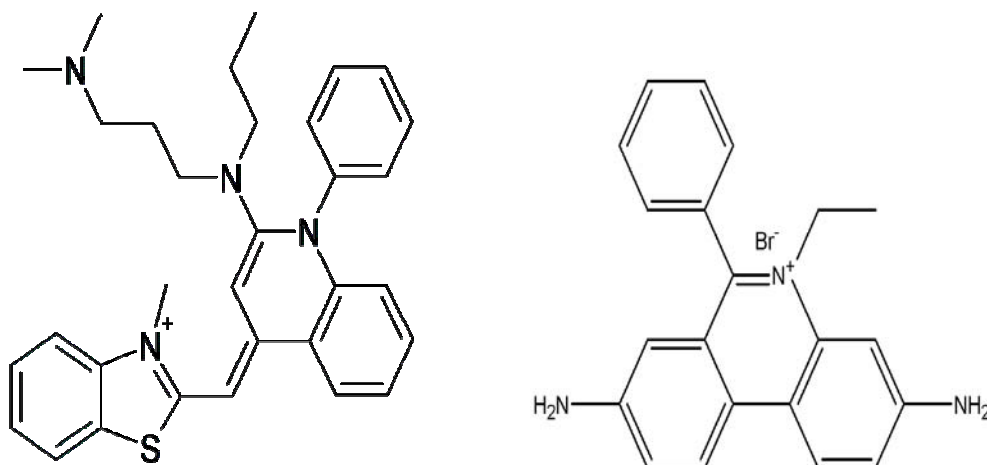
Sve vrste PCR-a u realnom vremenu zasnivaju se na principu detekcije i kvantifikacije fluorescentnih reportera koji produciraju signal koji se povećava proporcionalno sa količinom PCR produkta u reakciji. Danas se koristi nekoliko reagensa sa fluorescentnim signalom: DNK vezajuće boje, FRET probe, TaqMan probe, „molecular beacon“ i njihovi derivati (Amplifluor, Sunrise, Amplisensor i „scorpion primers“), dvolančane probe, iFRET, „universal template probe“ i aQRT-PCR (Yang, 2008).

Najjednostavniji i najjeftiniji tip PCR-a u realnom vremenu se zasniva na umetanju ili vezanju boje za dvolančanu DNK. Ovaj test se može primijeniti na već standardizirane PCR testove i ne zahtjeva dodatne fluorescentno označene oligonukleotide. Ipak, detektiraju se i specifični i nespecifični PCR produkti. Upravo iz tih razloga ti testovi zahtijevaju pažljivu optimizaciju PCR uvjeta i jasnu razliku između specifičnih i nespecifičnih PCR produkata koristeći analizu krivuljom topljivosti. Upravo zbog niže specifičnosti i dodatnih koraka analize, ovaj oblik testa nije pogodan za korištenje u dijagnostici, pa se koristi test proba specifičnih za sekvencu.

Umetajuća fluorescentna boja etidij bromid ili fluorescentne dvolančane DNA (dIDNA) vezajuće boje SYBR[®] Green i BEBO koriste se za praćenje umnažanja. Te boje ne fluoresciraju slobodne u otopini, već tek nakon vezanja na DNA (Nygren, 1998). Fluorescencija ovih boja raste kako nastaje dvolančani produkt, ali ne strogo proporcionalno. Naime, fluorescencija ovisi i o omjeru vezanja boja: baza i o samoj DNA sekvenci.

Etidij bromid (EtBr) se ubacuje između planarnih baznih parova dvolančane DNA. Ekscitacijom ultraljubičastim svjetlom EtBr fluorescira u vidljivom dijelu spektra. Boje koje se umeću u dIDNA su zbog svog afiniteta prema DNA mutagene, pa se danas više koriste asimetrične cijanin boje – SYBR Green i BEBO (Kubista 2006).

SYBR Green je fluorescentna boja koja se veže na manji utor dvolančane DNA. Ona fluorescira i kada nije vezana za DNA, ali joj se vezanjem fluorescencija znatno povećava. PCR produkt se detektira mjerenjem povećanja fluorescencije vezanjem boje za dIDNA.

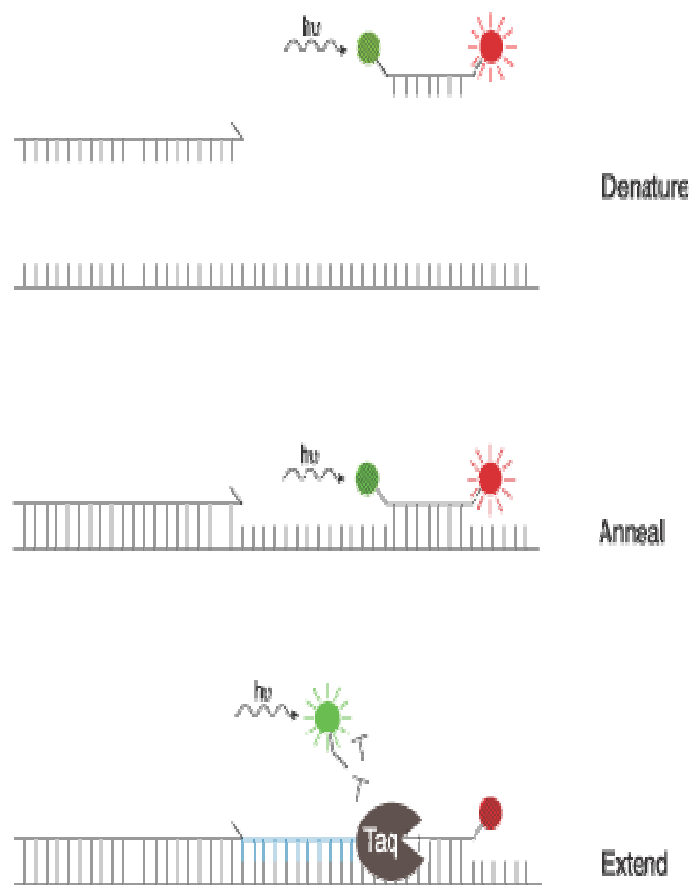


Slika 8: SYBR Green i etidij bromid (preuzeto s <http://en.wikipedia.org>)

Probe koje se zasnivaju na FRET tehnologiji rade po principu da molekula koja je donor fluorofora absorbira ekscitacijsku energiju i predaje tu energiju akceptoru fluorofora preko dipol-dipol interakcije. Takve probe su TaqMan, Amplisensor, molekularne oznake i UT probe (Zhang, 2003). Kada se donor i akceptor cijepanjem razdvoje, fluorescentna proba mijenja sekundarnu strukturu ili položaj na lancu što rezultira povećanjem fluorescencije.

TaqMan probe su oligonukleotidi koji imaju na 5' kraju vezanu „reporter“ boju, a na 3' kraju „quencher“, te hibridiziraju sa unutarnjom regijom PCR produkta. U nehibridiziranom stanju nema fluorescencijskog signala probe zbog blizine „reporter“ i „quencher“ boje. „Reporter“ je surpresiran FRET-om (eng. Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Tijekom PCR-a, kada dolazi do replikacije predloška za kojeg je TaqMan proba vezana, 5' egzonukleazna aktivnost polimeraze cijepa probu. Dolazi do razdvajanja „quencher“ i „reporter“ boje i nema više FRET-a. Fluorescencija se tako povećava u svakom ciklusu proporcionalno broju cijepanja proba. Dobro dizajnirana TaqMan proba zahtjeva vrlo malo optimizacije. Proba se može koristiti i kod multipleksnih testova ako se dizajnira sa jedinstvenim fluor/quench parom (Premier Biosoft International, 2009).



Slika 9: TaqMan proba u reakciji (preuzeto sa <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm>)

1.5. Kvantifikacija PCR produkta

Postoje kvalitativni i kvantitativni PCR testovi. U kvalitativnom testu postoji granična vrijednost ispod koje se rezultati smatraju negativnima, a iznad pozitivnima. Kvantitativni PCR testovi imaju poznatu gornju i donju granicu detekcije unutar koje je moguće detektirati količinu produkta u linearnom području. Kvantifikaciju PCR produkta omogućuje kvantifikacijski standard koji je smjesa nukleotidnih sekvenci poznate koncentracije. Kvantifikacijski standard može se dodati direktno u PCR smjesu za umnažanje, u uzorak s kojim prolazi sve faze izolacije ili se umnaža u posebnoj reakcijskoj tubi. Količina PCR produkta u uzorku određuje se količinom produkta u kvantifikacijskom standardu.

Kod korištenja kvantifikacijskog standarda u PCR umnažanju bitno je da ciljna sekvenca i kvantifikacijski standard koriste iste početnice, a različite sekvence koje omogućuju odvojenu detekciju.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Odjelu za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, od studenog 2007. do veljače 2008. godine. U istraživanje su uključene 64 osobe zaražene HIV-om. Uzorci plazme za kvantifikaciju HIV-1 RNK u zaraženih osoba prikupljeni su u okviru rutinskih dijagnostičkih postupaka.

2.2. Biološki uzorci

Uzorci periferne krvi uzimani su venepunkcijom u sterilnu VACUTAINER epruvetu s antikoagulansom K₃ EDTA (etildiamintetraoctena kiselina) ukupnog volumena 3 ml. Na volumen krvi od 1 ml dolazi 1.5 ml antikoagulansa kako bi konačna koncentracija K₃ EDTA bila 1.5 + ili - 0.15 mg/ml krvi. Uzorci su uzimani od 8-9 h ujutro, dopremljeni u Odjel unutar 1 h, te centrifugirani 10 min na 3 500 okretaja u minuti i pohranjeni su na -20°C do testiranja.

2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Uzorke plazme HIV-om zaraženih osoba uključenih u ovo istraživanje analizirala sam primjenom dvaju standardiziranih molekularnih testova za kvantifikaciju HIV-1 RNA: COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] Test, verzija 1.5 i COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test (Roche Diagnostics Systems, Inc., Branchburg, NJ). COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] Test, verzija 1.5 je klasični PCR test u kojem se umnožava segment veličine 155 parova baza u visoko konzerviranoj regiji HIV-1 *gag* gena primjenom početnica SK145 i SKCC1B. AMPLICOR test dostupan je u dvije verzije, obzirom na raspon detekcije.

Standardna verzija testa ima raspon detekcije od 400 do 750 000 kopija HIV-1 RNA/ml, dok je ultrasenzitivna verzija testa modificirana tako da ima raspon detekcije od 50 do 75 000 kopija HIV-1 RNA/ml.

Biološke uzorke HIV-om zaraženih osoba koje su liječene antiretrovirusnim lijekovima i kod kojih se očekivala vrlo niska viremija testirala sam ultrasenzitivnom verzijom testa (n=28). Uzorke HIV-om zaraženih osoba testirala sam i COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, standardiziranim testom koji se temelji na tehnici PCR-a u realnom vremenu (raspon detekcije od 40 do 10 000 000 kopija HIV-1 RNA po mililitru). Kao i u AMPLICOR testu i ovdje se umnaža sekvenca unutar visoko konzervirane regije HIV-1 *gag* gena, a probe su dvostruko označeni oligonukleotidi.

2.3.1. COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v. 1.5

COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v1.5 je dijagnostički test za određivanje broja HIV-1 RNA u ljudskoj plazmi koji se temelji na PCR metodi. Izolacija RNA se izvodi pomoću aparata COBAS AmpliPrep™ Instrument, dok se umnažanje ciljne sekvence i detekcija odvija pomoću aparata COBAS AMPLICOR™ Analyzer. COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v1.5 se temelji na pet glavnih procesa: pripremi uzoraka za izolaciju HIV-1 RNA; reverzne transkripcije ciljne RNA za dobivanje komplementarne DNA (cDNA); umnažanja ciljne cDNA PCR-om koristeći specifične komplementarne početnice; hibridizacije umnoženih produkta i oligonukleotidnih proba specifičnih za ciljnu sekvencu i detekciji umnoženih produkta vezanih za probu kolorimetrijskim određivanjem.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v1.5 omogućuje provedbu jedne od dviju verzija pripreme uzoraka: ultrasenzitivnu ili senzitivnu. Za standardnu verziju potrebno je 300 µL plazme, a za ultrasenzitivnu 750 µL plazme. COBAS AmpliPrep Instrument djelovanjem povišene temperature i kaotropskog sredstva oslobađa HIV-1 RNA iz virusnih čestica, dok pritom štiti RNK od RNaza iz plazme. Određeni broj molekula HIV-1 QS RNA (HIV-1 Quantitation Standard Armored RNA) dodaje se u svaki uzorak, zajedno sa reagensom za lizu i biotiniliranim pripremnim probama. Temperatura se zatim snizi kako bi se omogućila hibridizacija HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA na biotinilirane pripreme probe. Hibridni kompleksi se zatim vežu na magnetske čestice obilježene streptavidinom. COBAS AmpliPrep Instrument razdvaja takve čestice sa vezanom RNA od ostatka reakcijske smjese.

Uzorak koji u konačnici sadrži magnetske čestice obilježene streptavidinom sa vezanim HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA se dodaje u smjesu za umnažanje.

Tijekom reverzne transkripcije u PCR-u koristi se termostabilni rekombinantni enzim *Thermus thermophilus* DNA polimeraza (*rTth* pol). Dodatkom mangana i pri određenim puferskim uvjetima *rTth* pol ima aktivnost reverzne transkriptaze i DNA polimeraze što omogućuje da se oba procesa odvijaju u istoj reakcijskoj smjesi. Zagrijavanjem reakcijske smjese dolazi do vezanja „antisense“ početnica na ciljnu HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA, te djelovanjem *rTth* pol stvara se komplementarni DNA lanac (cDNA).

U procesu amplifikacije prvo dolazi do stvaranja dvolančane DNA vezanjem „sense“ početnica na cDNA lanac, te djelovanjem *rTth* pol. Vezanjem početnica SK145 i SKCC1B na ciljnu DNA, uz pomoć *rTth* pol, stvaraju se amplikoni. COBAS AMPLICOR Analyzer automatski ponavlja ovaj ciklus (broj ponavljanja programiran) svaki put udvostručujući broj amplikona. Umnožavanje se odvija samo u regiji HIV-1 genoma između početnica. Uporabom AmpErase[®] (uracil-N-glikozilaze) i deoksiuridin trifosfata (dUTP) sprječava se kontaminacija prijašnjim PCR produktima.

Nakon umnažanja PCR-om COBAS AMPLICOR Analyzer automatski omogućava denaturaciju HIV-1 amplikona i HIV-1 QS amplikona i stvaranje jednolančane DNK. Amplikon obilježen biotinom hibridizira sa specifičnom oligonukleotidnom detekcijskom probom vezanom na detekcijske magnetske čestice. Čestice se ispiru kako bi se odstranio nevezani materijal, te se dodaje konjugat avidin-peroksidaze iz hrena koji se veže za amplikon označen biotinom. Nevezani konjugat se ispiru i dodaje se otopina koja sadrži vodikov peroksid i 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB). U prisutnosti vodikovog peroksida hren peroksidaza vezana za magnetsku česticu katalizira oksidaciju TMB-a što stvara obojeni kompleks. COBAS AMPLICOR Analyzer mjeri apsorpciju na valnoj duljini od 660nm.

2.3.2. COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test

COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test ima automatsku pripremu uzoraka na COBAS[®] AmpliPrep Instrumentu koristeći sličan postupak kao i COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] Test, v1.5. COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test obrađuje 850 µL plazme. Razlika je što se HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA vežu na staklene magnetske čestice, a ne čestice prevučene streptavidinom. Nukleinske kiseline se zatim eluiraju sa magnetskih čestica.

Obrađeni uzorak koji sadrži staklene magnetske čestice te slobodnu HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA se dodaje u smjesu za umnažanje i premješta u COBAS[®] TaqMan[®] Analyzer.

Reakcije reverzne transkripcije i PCR umnažanja koriste termostabilnu rekombinantu enzima *Thermus species* DNA polimeraza (Z05). U prisutstvu mangana i određenim puferskim uvjetima Z05 ima i aktivnost reverzne transkriptaze i polimeraznu aktivnost. To omogućuje da se reverzna transkripcija i PCR umnažanje odvijaju zajedno sa detekcijom amplikona u realnom vremenu. U procesu reverzne transkripcije dodatkom mangana i suviška deoksinukleotid trifosfata Z05 polimeraza stvara DNA lanac komplementaran ciljnoj RNA.

Nakon reverzne transkripcije slijedi umnažanje gdje se kao produkt stvara amplikon, rezultat djelovanja Z05 i suviška deoksinukleotida na DNA lanac. U narednim ciklusima broj amplikona se povećava, a koliki će biti broj ciklusa programirano je u COBAS[®] TaqMan[®] Analyzer-u.

COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test koristi tehnologiju PCR-a u realnom vremenu. Korištenje dvostruko označenih fluorescentnih proba omogućuje detekciju akumulacije PCR produkta u realnom vremenu prateći jačinu emisije fluorescentnih boja oslobođenih tijekom procesa umnažanja. Probe su sastavljene od HIV-1 i HIV-1 QS specifičnih oligonukleotidnih proba sa „quencher“ i „reporter“ bojom. U COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Testu, HIV-1 i HIV-1 QS probe su označene različitim fluorescentnim „reporter“ bojama. Kad su probe netaknute fluorescencija „reporter“ boje je surpresirana blizinom „quencher“ boje. Tijekom PCR-a proba hibridizira sa ciljnom sekvencom i pocijepa se 5→3 nukleaznom aktivnošću Z05 DNA polimeraze. Kada se „reporter“ i „quencher“ boja oslobode i razdvoje, nema više surpresije, a fluorescentna aktivnost „reporter“ boje se povećava. Umnažanje HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA se mjeri neovisno na različitim valnim duljinama. Taj proces se ponavlja određen broj ciklusa, s tim da se u svakom ciklusu efektivno povećava jačina emisije pojedine „reporter“ boje što omogućava nezavisnu identifikaciju HIV-1 RNA i HIV-1 QS RNA.

2.4. Statističke metode

Za statističku obradu podataka koristila sam statistički program SAS (verzija 8.2., SAS Institute, Cary, North Carolina, USA).

2.5. Reagencije i otopine

2.5.1. COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v. 1.5

Priprema uzoraka i kontrole:

HIV-1 CS1, v1.5 (HIV-1 MONITOR Bead Reagent Cassette, v1.5)

Sastav: natrij fosfatni pufer, natrijev klorid, < 5% suspenzija paramagnetskih čestica Dynabeads® prevučениh streptavidinom, < 0.05% deterdžent, 0.09% natrijev azid

HIV-1 CS2, v1.5 (HIV-1 MONITOR Lysis Reagent Cassette, v1.5)

Sastav: Tris-HCl pufer, 44% gvanidin tiocijanat, 2.5% ditiotritol, < 10% polietilen glikol, < 0.5% deterdžent

HIV-1 CS3, v1-5 (HIV-1 MONITOR Multi Reagent Cassette) sadrži:

HIV-1 PROBE, v1.5 (HIV-1 MONITOR Probe Reagent, v1.5)

Sastav: Tris-HCl pufer, < 0.001.5 HIV-1 specifične oligonukleotidne probe HA152BH, HA152-109BH i KY895BP, EDTA, 0.09% natrijev azid

HIV-1 QS, v1.5 (HIV-1 MONITOR Quantitation Standard, v1.5)

Sastav: Tris-HCl pufer, <0.001% „Armored“ RNK konstrukt koji sadrži HIV-1 preparacijsku probu i sekvence koje se vežu za početnicu, te jedinstvenu regiju za vezanje detekcijske probe (neinfektivna RNK u MS2 bakteriofagu) < 0.005% poli rA RNK (sintetska), EDTA, 0.09% natrijev azid

HIV-1 DIL, v1.5 (HIV-1 MONITOR Specimen Diluent, v1.5)

Sastav: Tris-HCl pufer, < 0.05% aurintrikarboksilna kiselina, < 0.01% biotin, < 0.005% poli rA RNK (sintetska), < 30% etilen glikol, EDTA, 0.09% natrijev azid

HIV-1 H(+)/C, v1.5 [HIV-1 MONITOR High (+) Control, v1.5]

HIV-1 STD L(+)/C, v1.5 [HIV-1 MONITOR Standard Low Positive Control, v1.5]

HIV-1 L(+)/C, v1.5 [HIV-1 MONITOR Low (+) Control, v1.5]

Sastav: < 0.001% „Armored“ RNK konstrukt koji sadrži HIV-1 sekvence (neinfektivna RNK u MS2 bakteriofagu), negativna ljudska plazma (nereaktivna na antitijela za HCV, antitijela za HIV-1/2, HIV p24 antigen i HBsAg), 0.1% ProClin[®] 300

CAP (-)/C [COBAS[®] AmpliPrep Negative Control (Human Plasma)]

Sastav: negativna ljudska plazma (nereaktivna na antitijela za HCV, antitijela za HIV-1/2, HIV p24 antigen i HBsAg), 0.1% ProClin[®] 300

Amplifikacija i detekcija:

HIV-1 MMX, v1.5 (HIV-1 MONITOR Master Mix, v1.5)

Sastav: bicin pufer, glicerol, < 0.01% rTh DNK polimeraza, kalijev acetat, < 0.07% dATP, dCTP, dGTP, dUTP i dTTP, < 0.001% početnice SKCC1B i SK145, < 0.01% AmpErase, 0.05% natrijev azid

HIV-1 Mn²⁺, v1.5 (HIV-1 MONITOR Manganese Solution, v1.5)

Sastav: < 2% manganaza, octena kiselina, amarant boja, 0.05% natrijev azid

AD3 (Amplicon Dilution Reagent)

Sastav: EDTA, 0.8% natrijev hidroksid

SM PS1, v1.5 (HIV-1 MONITOR Probe Suspension 1, v1.5)

Sastav: MES pufer, < 0.01% suspenzija paramagnetskih čestica Dynabeads[®] prevučених HIV-1 specifičnom oligonukleotidnom probom (SK102), 0.09% natrijev azid

SM4, v1.5 (HIV-1 MONITOR Probe Suspension 2, v1.5)

Sastav: natrij fosfatni pufer, < 0.2% solubilizator, 24.9% natrijev tiocijanat

SQ PSI, v1.5 (HIV-1 MONITOR Quantitation Standard Probe Suspension 1, v1.5)

Sastav: MES pufer, < 0.01% suspenzija paramagnetskih čestica Dynabeads[®] prevučenih specifičnom oligonukleotidnom capture probom (HIV-1 kvantifikacijski standard (CP3), 0.09% natrijev azid

SQ4, v1.5 (HIV-1 MONITOR Quantitation Standard Probe Suspension 2, v1.5)

Sastav: natrij fosfatni pufer, < 0.2% solubilizator, 24.9% natrij tiocijanat

DN4 (Denaturation Solution)

Sastav: 1.6% natrijev hidroksid, EDTA, timol plavo, 1.6% natrijev hidroksid

CN4 (Avidin-Horseradish Peroxidase Conjugate)

Sastav: Tris-HCl pufer, < 0.001% avidin- peroksidaza iz hrena, goveđi serumski albumin, Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.), 0.1% fenol, 1% ProClin[®] 150

SB3 (Substrate A)

Sastav: otopina citrata, 0.01% vodikov peroksid, 0.1% ProClin[®] 150

SB (Substrate B)

Sastav: 0.1% 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidin (TMB), 40% dimetilformamid (DMF)

COBAS[®] AmpliPrep System Wash Reagent

Sastav: Tris-HCl pufer, <2% kalijev acetat, < 0.05% deterdžent, 0.3% natrijev azid

COBAS[®] AMPLICOR Wash Buffer

2.5.2. COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test

HIV-1 CS1 (HIV-1 Magnetic Glass Particles Reagent Cassette)

Sastav: magnetske staklene čestice, 93% izopropanol

HIV-1 CS2 (HIV-1 Lysis Reagent Cassette)

Sastav: natrij citrat dihidrat, 42.5% gvanidin tiocijanat, < 14% polidokanol, 0.9% ditiotreititol

HIV-1 CS3 (HIV-1 Multi Reagent Cassette) sadrži:

Pase (Protein Solution)

Sastav: Tris-HCl pufer, < 0.05% EDTA, kalcijev klorid, kalcijev acetat, ≤ 7.8% proteinaza, glicerol

EB (Elution Buffer)

Sastav: Tris-base pufer, 0.2% metilparaben

HIV-1 CS4 (HIV-1 Test Specific Reagent Cassette) sadrži:

HIV-1 QS (HIV-1 Quantitation Standard)

Sastav: Tris-HCl pufer, EDTA, < 0.005% poli rA (sintetska), < 0.001% „Armored“ HIV-1 RNK konstrukt koji sadrži sekvencu za vezanje HIV-1 početnice i jedinstvenu regiju za vezanje probe (neinfektivna RNK u MS2 bakteriofaga), 0.05% natrijev azid

HIV-1 MMX (HIV-1 Master Mix)

Sastav: tricin pufer, kalijev acetat, kalijev hidroksid, 20% dimetilsulfoksid, glicerol, < 0.04% dATP, dCTP, dGTP, dUTP i dTTP, < 0.003% uzvodne i nizvodne početnice za gag regiju HIV-1, < 0.003% oligonukleotidnih aptamera, < 0.003 fluorescentno označene oligonukleotidne probe specifične za HIV-1 i HIV-1 QS, < 0.05% Z05 DNK polimeraza (mikrobijalna), < 0.1% AmpErase (uracil-N-glikozilaza) enzim (mikrobijalni), 0.09% natrijev azid

CAP/CTM Mn²⁺ (CAP/CTM Manganese Solution)

Sastav: < 0.5% manganovog acetata, glacijalna octena kiselina, 0.09% natrijev azid

HIV-1 H(+)/C (HIV-1 High Positive Control)

HIV-1 L(+)^C (HIV-1 Low Positive Control)

Sastav: < 0.001% „Armored“ HIV-1 RNK konstrukt koji sadrži HIV-1 sekvence (Neinfektivna RNK u MS2 bakteriofagu), negativna ljudska plazma (nereaktivna na antitijela za HCV, antitijela za HIV-1/2, HIV p24 antigen i HBsAg, 0.1% ProClin[®] 300 prezervativ

CTM (-)^C [COBAS[®] TaqMan[®] Negative Control (Human Plasma)]

Sastav: negativna ljudska plazma (nereaktivna na antitijela za HCV, antitijela za HIV-1/2, HIV p24 antigen i HBsAg, 0.1% ProClin[®] 300 prezervativ

COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] Wash Reagent

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je odrediti broj kopija HIV-1 RNA u plazmi zaraženih osoba primjenom dvaju standardiziranih molekularnih metoda i usporediti dobivene rezultate kako bi se odredila sukladnost metoda. COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR™, verzija 1.5 test se temelji na principu klasičnog PCR-a i predstavlja standardnu metodu u kliničkim laboratorijima. Novi COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 test se temelji na principu PCR-a u realnom vremenu a dostupan je od 2008. g.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju određivala sam broj kopija HIV-1 RNA u mililitru plazme. Od ukupno 64 pacijenata, 36 sam analizirala standardnom verzijom, a 28 ultrasenzitivnom verzijom klasičnog PCR-a (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] Test, verzija 1.5). PCR-om u realnom vremenu (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test) analizirala sam svih 64 pacijenata. Rezultati analize prikazani su u Tablici 1. i Tablici 2., te na Slici 10. i Slici 11.

Statističkom analizom („dependent T-test“) usporedbe klasičnog PCR-a (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] Test, verzija 1.5) i PCR-a u realnom vremenu (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test) dokazala sam statistički značajnu razliku između metoda ($P=0.02$). Spearmanovim testom korelacije izračunala sam koeficijent korelacije (R).

Tablica 1. Rezultati analize broja kopija HIV-1 RNA u plazmi određenih klasičnim PCR-om i PCR-om u realnom vremenu za pacijente analizirane standardnom verzijom klasičnog PCR-a.

Šifra uzorka	Datum uzorka	Klasični PCR (log kop. HIV-1 RNA / ml plazme)	Real-time PCR (log kop. HIV-1 RNA / ml plazme)	Log razlika (* = razlika veća od 0,5)
1/07	10.10.2007	3,78	3,28	0,51*
2/07	12.10.2007	4,89	3,72	1,17*
3/07	12.10.2007	4,17	3,20	0,97*
4/07	17.10.2007	3,48	3,64	0,16
5/07	18.10.2007	6,09	6,03	0,07
6/07	19.10.2007	3,22	3,25	0,03
7/07	22.10.2007	4,95	2,97	1,98*
8/07	25.10.2007	5,39	4,78	0,61*
9/07	25.10.2007	4,80	1,90	2,89*
10/07	26.10.2007	4,47	3,76	0,71*
11/07	26.10.2007	3,16	3,15	0,01
12/07	29.10.2007	2,72	3,48	0,76*
13/07	30.10.2007	5,97	5,54	0,43
14/07	5.11.2007	5,35	5,20	0,15
15/07	7.11.2007	4,43	3,81	0,62*
16/07	9.11.2007	3,55	3,18	0,37
17/07	12.11.2007	3,93	4,24	0,31
18/07	12.11.2007	3,52	3,73	0,21
19/07	16.11.2007	2,44	3,42	0,98*
20/07	19.11.2007	4,37	4,00	0,38
21/07	20.11.2007	4,54	4,00	0,54*
22/07	20.11.2007	3,73	3,75	0,02
23/07	27.11.2007	5,05	4,75	0,30
24/07	28.11.2007	4,44	4,66	0,22
25/07	3.12.2007	3,41	3,05	0,36
26/07	4.12.2007	5,59	4,85	0,74*
27/07	5.12.2007	5,66	5,81	0,15
28/07	6.12.2007	3,16	5,08	1,93*
29/07	12.12.2007	3,71	1,76	1,95*
30/07	12.12.2007	4,85	2,26	2,60*
31/07	13.12.2007	4,57	4,38	0,19
32/07	14.12.2007	2,50	1,73	0,76*
33/07	18.12.2007	4,73	5,03	0,30
34/07	19.12.2007	4,12	3,57	0,55*
35/07	24.12.2007	4,99	3,49	1,50*
36/07	28.12.2007	2,63	2,81	0,17

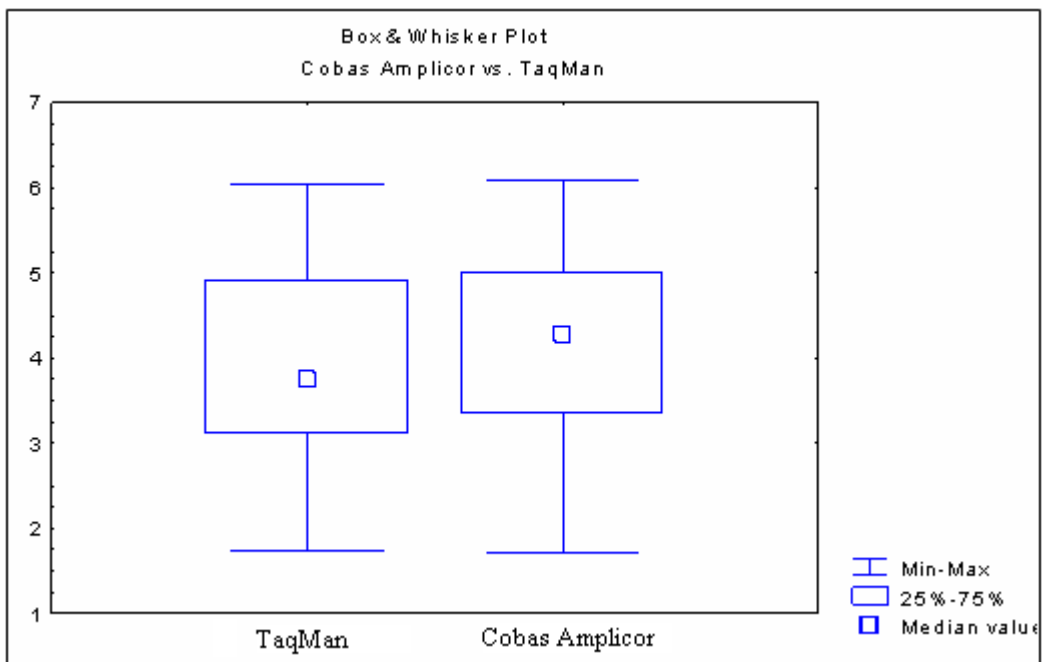
Tablica 2. Rezultati analize broja kopija HIV-1 RNA u plazmi određenih klasičnim PCR-om i PCR-om u realnom vremenu za pacijente analizirane ultrasenzitivnom verzijom klasičnog PCR-a.

Šifra uzorka	Datum uzorka	Klasični PCR (log kop. HIV-1 RNA / ml plazme)	Real-time PCR (log kop. HIV-1 RNA / ml plazme)	Log razlika (* = razlika veća od 0,5)
37/07	11.10.2007	4,06	5,12	1,06*
38/07	12.10.2007	5,80	6,03	0,23
39/07	15.10.2007	5,47	5,11	0,36
40/07	15.10.2007	4,95	5,64	0,69*
41/07	17.10.2007	2,61	2,29	0,33
42/07	18.10.2007	3,33	3,06	0,27
43/07	19.10.2007	1,81	2,96	1,15*
44/07	24.10.2007	3,36	3,32	0,04
45/07	29.10.2007	5,05	5,32	0,27
46/07	29.10.2007	4,89	4,61	0,28
47/07	30.10.2007	2,24	1,96	0,28
48/07	30.10.2007	2,06	2,36	0,30
49/07	5.11.2007	3,97	3,24	0,73*
50/07	7.11.2007	4,93	4,87	0,06
51/07	13.11.2007	2,27	2,32	0,04
52/07	13.11.2007	4,18	4,57	0,39
53/07	16.11.2007	2,93	3,03	0,10
54/07	20.11.2007	5,31	5,33	0,02
55/07	21.11.2007	5,19	4,98	0,21
56/07	22.11.2007	2,51	2,88	0,37
57/07	26.11.2007	3,91	3,15	0,76*
58/07	29.11.2007	5,64	3,23	2,41*
59/07	29.11.2007	5,59	5,19	0,40
60/07	5.12.2007	4,11	4,45	0,34
61/07	10.12.2007	5,37	5,00	0,38
62/07	18.12.2007	5,65	5,62	0,03
63/07	20.12.2007	1,71	1,84	0,13
64/07	27.12.2007	4,85	4,70	0,15

Medijan razlike logaritama broja kopija HIV-1 RNK u plazmi određenih klasičnim PCR-om i PCR-om u realnom vremenu u 64 uzorka iznosi -0.17357266. Najmanja razlika logaritama broja kopija HIV-1 RNK u plazmi je -0.009208, a najveća -2.893484346.

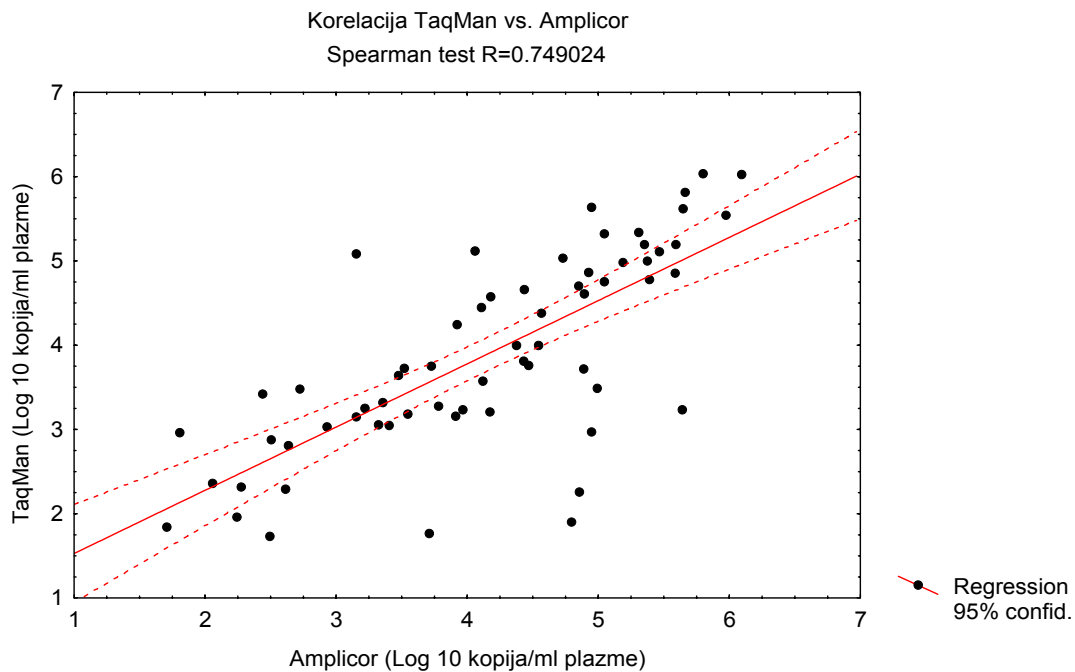
Razlika u viremiji dobivenoj s dva PCR testa je u 23 (36.5%) od ukupno 64 analizirana uzorka bila veća od $> 0,5 \log_{10}$.

Medijan (\pm standardna devijacija) broja kopija HIV-1 RNK u plazmi određen Cobas Amplicor metodom iznosi 4.276863 (\pm 1.148994) log kopija HIV-1 RNA/ml plazme, odnosno, 3.7398595 (\pm 1.165605) log kopija HIV-1 RNA/ml plazme određene TaqMan metodom (Slika 10).



Slika 10. Usporedba HIV-1 RNA TaqMan i Amplicor metode

Koeficijent korelacije usporedbe HIV-1 RNA TaqMan i Amplicor metode iznosi 0.749024 (Slika 11).



Slika 11. Korelacija HIV-1 RNA TaqMan i Amplicor metode

5. RASPRAVA

Rezultati ovog rada pokazali su da novi PCR test u realnom vremenu analitički podcjenjuje broj kopija HIV-1 RNA u plazmi te da rezultati novog testa nisu usporedivi sa standardnim klasičnim PCR testom.

Određivanje broja kopija HIV-1 RNA u plazmi, uz određivanje apsolutnog broja CD4+ T-limfocita, najvažniji je parametar u praćenju progresije HIV-bolesti kao i pokazatelj uspješnosti antiretrovirusne terapije.

Najčešće korišten test za određivanje viremije u kliničkim laboratorijima je klasični PCR test (AMPLICOR) koji je validiran i analitički i klinički u stotinama laboratorija širom svijeta. Međutim, razvoj PCR tehnologije posebice u smislu usavršavanja PCR-a u realnom vremenu doveo je do razvoja novih testova koje je potrebno usporediti sa standardnom metodom (klasični PCR test) prije šire uporabe. Novi TaqMan test za kvantifikaciju HIV-1 RNA temelji se na tehnologiji PCR-a u realnom vremenu je brža metoda sa širim rasponom detekcije i nižom donjom granicom detekcije (Perrin, 2006). TaqMan metoda, također, ne zahtjeva nikakvu manualnu intervenciju između dodataka uzoraka i dobivanja rezultata što smanjuje mogućnost kontaminacije (Oliver, 2007).

U ovom istraživanju usporedila sam rezultate kvantifikacije uzoraka klasičnim PCR-om (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] verzija 1.5 test) i PCR-om u realnom vremenu (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 test).

Ranija istraživanja pokazala su neslaganje između vrijednosti viremija istih uzoraka određivanih različitim metodama (Hodara, 1998; Lin, 1998; Nolte, 1998; Segondy 1998), te se za praćenje pacijenta preporuča korištenje iste metode (Hodara, 1998; Segondy 1998).

Lima i sur.(2009) i Perrin i sur.(2007) govore o boljoj osjetljivosti TaqMan metode pri donjim granicama detekcije, te kvantificiranje viremije u uzorcima sa manje od 50 kopija HIV-1 RNA/ml plazme. U ovom istraživanju analizirala isključivo uzorke koji su imali detektabilnu viremiju AMPLICOR metodom.

Literaturni podaci o usporedbi AMPLICOR i TaqMan metode prilično su kontroverzni. Primjerice, Damond i sur. (2007) ukazuju na neslaganje između dvaju metoda i dovode u pitanje pouzdanost kvantifikacije HIV-1 RNA TaqMan-om. Istraživanja Olivera i sur. (2007) pak pokazuju visoku korelaciju između metoda, dok Perrin i sur. (2006) čak preporučuju TaqMan kao bolju metodu kvantifikacije HIV-1 RNA.

U ovom istraživanju odredila sam viremiju za 64 uzorka koristeći i COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] verzija 1.5 test i PCR-u realnom vremenu (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 test) te dokazala statistički značajnu razliku u viremiji mjerenu s ovim metodama.

Damond i sur.(2007) su usporedbom istih metoda također ukazali na statistički značajnu razliku viremije. Suprotno tome, Oliver i sur. (2007) su dokazali dobru korelaciju između dvije metode (koeficijent korelacije 0.95). Obzirom na to da su obje grupe radile na uzorcima koji su prikupljeni na identičan način i da su slijedile isti protokol istraživanja, jasno je da je potrebno je napraviti dodatna istraživanja koja bi razjasnila tako različite rezultate studija.

Daljnjom statističkom analizom izračunala sam razliku logaritama viremija određenih sa COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] AMPLICOR HIV-1 MONITOR[™] verzija 1.5 test i PCR-u realnom vremenu (COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 test) i pokazala da u više od trećine uzoraka PCR-a u realnom vremenu podcijenjuje viremiju za više od $0.5 \log_{10}$ viremije.

Wolff i Gerritzen (2007) te Oliver i sur. (2007) u svojim istraživanjima pokazali su dobru linearnu korelaciju ovih dvaju metoda ($R=0.85$, odnosno 0.95). Wolff i Gerritzen (2007) te Oliver i sur. (2007) su predložili uvođenje novog PCR testa u realnom vremenu u kliničke laboratorije.

Rezultati ovog istraživanja nisu u skladu sa rezultatima Wolff i Gerritzen (2007) te Oliver i sur. (2007). Statističkom obradom rezultata usporedbe dvaju metoda izračunala sam koeficijent korelacije (R) koji iznosi 0.749024 što ukazuje na neslaganje među metodama i, upravo suprotno, ne preporuča TaqMan kao metodu kvantifikacije.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada pokazali su da novi PCR test u realnom vremenu analitički podcjenjuje broj kopija HIV-1 RNA u plazmi te da rezultati novog testa nisu usporedivi sa standardnim klasičnim PCR testom.

7. LITERATURA

Begovac J (2005) Liječenje HIV infekcije. HIV/AIDS-info 2: 4-9.

Burton GF, Keele BF, Estes JD, Thacker TC, Gartner S (2002) Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. *Semin. Immunol.* 14: 275-284.

Campbell SM, Crowe SM, Mak J (2001) Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* 22: 217-27.

Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* 174: 1550-7.

Cimarelli A, Darlix JL (2002) Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1166-1184.

Damond F, Roquebert B, Bernard A, Collin G, Miceli M, Yeni P, Brun-Vezinet F, Descamps D (2007) Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) plasma load discrepancies between the Roche COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Version 1.5 and the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 assays. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3436-3438.

Ferguson MR, Rojo DR, von Linden JJ, O'Brien WA (2002) HIV-1 replication cycle. *Clin. Lab. Med.* 22: 611-635.

Freed EO (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251: 1-15.

Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M (1998) HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* 333: 504.

Gottlinger HG (2001) The HIV-1 assembly machine. *AIDS* 15: S13-S21.

HIV/AIDS and Hepatitis C Information Website (2009) Zdravlje i liječenje.
<http://www.multiculturalhivhepc.net.au/croatian/portal.asp?lang=cro>

Hodara V; Pedneault L, Hollinger FB (1998) HIV-1 viral load: comparative evaluation of three commercially available assays in Argentina. *Acta. Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 48: 107-113.

HUHIV (2009) Oportunističke infekcije.
<http://www.huhiv.hr/hiv/rjecnik/oportunisticke-infekcije/>

Hrvatski Zavod za Javno Zdravstvo (2009) Epidemiologija HIV infekcije i AIDS-a u Hrvatskoj. <http://www.hzjz.hr/epidemiologija/hiv.htm>

Kahn JO, Walker BD (1998) Acute Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 331: 33-39.

Kallings LO (2008) The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/AIDS. *J. Intern. Med.* 263: 218-43.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects med.* 27: 95-125.

Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-6.

Lima V, Harrigan R, Montaner JS (2009) Increased reporting of detectable plasma HIV-1 RNA levels at the critical threshold of 50 copies per milliliter with the TaqMan assay in comparison to the Amplicor assay. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 51: 3-6.

Lin HJ, PedneaultL, Hollinger FB (1998) Intra-assay performance characteristics of five assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 36: 835-839.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4: 357-62.

McCutchan FE (2000) Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 14: S31-S44.

Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA, Capon DJ (1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313: 450-8.

Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56-61, 64-5.

Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA (1994) *The polymerase chain reaction.* Birkhäuser, Boston.

Nolte FS, Boysza J, Thurmond C, Clark WS, Lennox JL (1998) Clinical comparison of an enhanced-sensitivity branched-DNA assay and reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J.Clin.Microbiol.* 36: 716-720.

Nygren J, Svanik N, Kubista M (1998) The interaction between the fluorescent dye thiazol orange and DNA. *Biopolymers* 46: 39-51.

Oliver AR, Pereira SF, Clark DA (2007) Comparative evaluation of the automated Roche TaqMan Real-time quantitative Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA PCR assay and the Roche AMPLICOR version 1.5 conventional PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3616-3619.

Perrin L, Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Sarrazin C, Zeuzem S, Colucci G (2006) Multicenter performance evaluation of a new TaqMan PCR assay for monitoring Human Immunodeficiency Virus RNA load. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4371-4375.

Piatak M, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD (1993) High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259: 1749-1754.

Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313: 277-84.

Robertson S, Anderson J, Bradac J, Carr JK, Foley B, Gunkhouser RK, Grao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B (2000) HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288: 55-56.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-4.

Schiller DS, Youseff-Bessler M (2009) Etravirine: A second generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) active against NNRTI-resistant strains of HIV. *Clin. Ther.* 31: 692-704.

Segondy M, Izopet J, Pellegrin I, Montes B, Dumon B, Pasquier C, Peeters M, Fleury HJ, Puel J, Reynes J (1998) Comparison of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 2.0 assay with the AMPLICOR HIV-1 MONITOR 1.0 assay for quantitation of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma of patients receiving stavudine-didanosine combination therapy. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3392-3395.

Simmons G, Reeves JD, Hibbitts S, Stine JT, Gray PW, Proudfoot AE, Clapham PR (2000) Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunol. Rev.* 177: 112-126.

Todd AV, Fuery CJ, Impey HL, Applegate TL, Haughton MA (2000) DzyNA-PCR: use of DNazymes to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format. *Clin. Chem.* 46: 625-630.

World Health Organisation (2009) 2007 AIDS epidemic update.

http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf

Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, de Haas F, Welker R, Kräusslich HG, Boulanger P, Fuller SD (2001) Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75: 759-71.

Wolff D, Gerritzen A (2007) Comparison of the Roche COBAS Amplicor™ Monitor, Roche COBAS Ampliprep™/COBAS TaqMan™ and Abbott RealTime™ Test assays for quantification of hepatitis C virus and HIV RNA. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45: 917-922.

Wyatt R, Sodorski J (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science* 280: 1884-8.

Yang L, Liang W, Jiang L, Li W, Cao W, Wilson ZA, Zhang D (2008) A novel universal real-time PCR system using the attached universal duplex probes for quantitative analysis of nucleic acids. *BMC Mol. Biol.* 9: 54.

Zhang Y, Zhang D, Li W, Chen J, Peng Y, Cao W (2003) A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Res.* 31: 123.