



ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

LabForum



cobas[®]
Life needs answers



Szanowni Państwo!

Wykorzystanie Polskiej Prezydencji w Radzie Unii Europejskiej 2011 do wyrównywania szans w systemie ochrony zdrowia, pod takim hasłem odbyła się niedawno konferencja zorganizowana przez Izbę Producentów i Dystrybutorów Diagnostyki Laboratoryjnej. Hasło przewodnie II FORUM IVD brzmiało „Diagnostyka zdrowia a zdrowa diagnostyka”. Wydarzenie to uzyskało patronat polskiej prezydencji w Unii Europejskiej.

Partnerami konferencji były stowarzyszenia i organizacje: Polskie Towarzystwo Diagnostyki Laboratoryjnej, Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów oraz Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce.

Organizatorzy stwierdzili, że zasób informacji diagnostycznej, pozyskiwanej dla celów medycznych, jest w Polsce kilka razy mniejszy niż średnia europejska. W związku z tym stwarza to poważne ograniczenia we wczesnym i szybkim diagnozowaniu pacjentów oraz podejmowaniu właściwych decyzji dotyczących leczenia. Wpływa to również na poziom ryzyka ponoszonego przez polski system ochrony zdrowia, gdyż wzrasta skuteczność dochodzenia praw należnych pacjentom. Dlatego zwiększone korzystanie z szeregu badań laboratoryjnych przyniosłoby znaczącą poprawę sprawności systemu ochrony zdrowia i większą efektywność wydatków publicznych.

W konferencji wzięło udział wielu wybitnych przedstawicieli polskiego i europejskiego środowiska medycznego, m.in. Adam Fronczak (wiceminister zdrowia RP), prof. dr hab. Leszek Czurpniak (prezes PTD), prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz (przewodnicząca PTM), prof. dr hab. Jan Kanty Kulpa (konsultant krajowy ds. diagnostyki laboratoryjnej), prof. dr hab. Jerzy Naskalski (prezes KMLwP), dr Ewa Puacz (prezes KIDL), prof. dr hab. med. Bolesław Samoliński (przewodniczący podkomisji ds. priorytetów MZ; Wiceprzewodniczący Grupy Roboczej Polskiej Prezydencji w Radzie UE), dr Jürgen Schulze (prezydent EDMA), Bogdan Solnica (prezes PTDL) i wiele innych osobistości. Szczegóły programu dostępne są na stronie: <http://www.ipddl.pl>. Fotoreportaż na ostatniej stronie LF.

Gorąco popieramy tego typu wydarzenia, jesteśmy przekonani, że podobne inicjatywy mogą z powodzeniem wzbogacić program działania Polskiej Prezydencji w Radzie Unii Europejskiej.

Zachęcam do lektury bieżącego numeru, życzę miłych wakacji i udanego odpoczynku.

Andrzej Banaszkiewicz
wraz z zespołem RDP

Spis treści:

Aktualności	2
Zakażenie HSV – rzeczywistość	3–6
Postępy w technologii PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), cz. I	7–11
Co to są wahania glikemii?	12–15
II Forum IVD	16

Zakażenie HSV – rzeczywistość

Anna Boroń-Kaczmarek, Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Wirus opryszczki pospolitej (*Herpes simplex virus*, HSV; HHV) to szeroko rozpowszechniony drobnoustrój dobrze adaptujący się do organizmu gospodarza (faza latencji), który jednak powodować może szereg różnych chorób.

Wyróżnia się dwa typy wirusa, tj. *Herpes virus* typ 1 (HSV-1) oraz *Herpes virus* typ 2 (HSV-2). Obydwa typy są filogenetycznie podobne, różnią się jednak epidemiologią. HSV-1 powoduje często chorobę zlokalizowaną w obrębie twarzy lub jamy ustnej, natomiast HSV-2 – w obrębie narządów płciowych. Lokalizacja zmian opryszczkowych nie wskazuje jednak, który z typów wirusa jest tutaj czynnikiem sprawczym.

EPIDEMIOLOGIA

Ponad 80% zakażeń HSV ma przebieg bezobjawowy. Objawowa infekcja może mieć zróżnicowany przebieg kliniczny niekiedy z rozwojem choroby zagrażającej życiu chorego.

Z uwagi na znaczne rozpowszechnienie zakażenia HSV w populacji ludzi oraz wynikające z tego faktu konsekwencje zdrowotne dotyczące zwłaszcza noworodków – infekcja wirusem HSV należy do istotnych problemów zdrowia publicznego.

Zakażenie HSV przenosi się wśród ludzi poprzez kontakt bezpośredni z uwagi na fakt, że wirus obecny jest w ślinie, łzach, wydzielinie narządów płciowych i innych płynach ustrojowych. W oparciu o dostępne dane epidemiologiczne, przyjmuje się, że ryzyko infekcji wynikające z kontaktu z osobą zakażoną sięga 80%.

Wyróżnia się trzy typy epizodów opryszczkowych:

1. Pierwotne zakażenie – okres wylegania waha się od 5 do 15 dni. Zakażenie może mieć charakter subkliniczny
2. Reaktywacja zakażenia – objawy kliniczne w wyniku aktywacji latentnego zakażenia HSV
3. Inicjacja lub pierwotne zakażenie – zakażenie klinicznie jawne lub bezobjawowe dotyczące tej okolicy ciała, która poprzednio nie była miejscem posadowienia wirusa. Istnieje ryzyko przeniesienia zakażenia (autoinokulacja) z jednego miejsca ciała na drugie, np. poprzez drapanie zmiany chorobowej. Uważa się, że zakażenie HSV-1 dotyczy głównie górnych części ciała, natomiast zakażenie HSV-2 – dolnych części ciała. Ale też około 40% izolatów wirusa ze zmian opryszczkowych okolic narządów płciowych to HSV-1; natomiast ze zmian chorobach okolicy twarzy – 5% izolatów to HSV-2. Należy zatem podkreślić, że wirusy HSV-1 i HSV-2 mogą być odpowiedzialne za opryszczkę narządów płciowych i stanowić przyczynę zróżnicowanych epizodów chorobowych, również o ciężkim przebiegu klinicznym.

Pierwotne zakażenie najczęściej ma miejsce do 5. roku życia dziecka oraz w okresie dojrzewania. Nawracające zakażenie HSV dotyczy natomiast około 45% zakażonych doustnie i 60% – zakażonych drogą płciową. Opryszczkowe zmiany oczne u około 40% pacjentów są objawem reaktywacji już istniejącej infekcji. Największym problemem klinicznym jest jednak choroba opryszczkowa noworodków prowadząca niekiedy do zgonu. Ciężarne z pierwotnym zakażeniem HSV stanowią zagrożenie dla swojego dziecka w około 30–50%, natomiast kobiety w ciąży z nawrotową opryszczką – w około 3%.

PATOMECHANIZM

Infekcja HSV, obok wymienionych powyżej postaci klinicznych jak pierwotne zakażenie, reaktywacja zakażenia czy nadkażenie charakteryzuje się także neurowirulencją, tj. zdolnością do inwazji i replikacji w układzie nerwowym.



Analizator cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów



cobas® 6000

· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



Analizator cobas e 411

· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

Podczas pierwotnego zakażenia mają miejsce następujące zjawiska:

- zakażenie powierzchownych warstw skóry i błon śluzowych włączając: rogówkę, jamę ustną, narządy płciowe i skórę
- inwazja lokalnych neuronów czuciowych
- trwająca całe życie latencja w zwojach nerwów czuciowych (krzyżowy zwój przy zakażeniu HSV-2) i w zwoju nerwu trójdzielnego – przyczyna nawracających opryszczek wargowej i/lub ocznej.

W okresie latencji, wirus nie jest aktywny, tj. nie wykazano zjawiska replikacji HSV. Reaktywacji zakażenia HSV sprzyjają takie czynniki jak: zmiany hormonalne, stres, ekspozycja na promienie ultrafioletowe, podróże i inne czynniki osłabiające odporność zakażonego.

OBRAZ KLINICZNY ZAKAŻENIA HSV

Kliniczne konsekwencje zakażenia HSV są wysoce zróżnicowane i wahają się od bezobjawowego zakażenia do zagrażających życiu chorób jak opryszczkowe zapalenie mózgu lub choroba opryszczkowa noworodków. Nawracające zakażenia innym typem HSV są często postrzegane w praktyce klinicznej.

Postaci kliniczne choroby opryszczkowej:

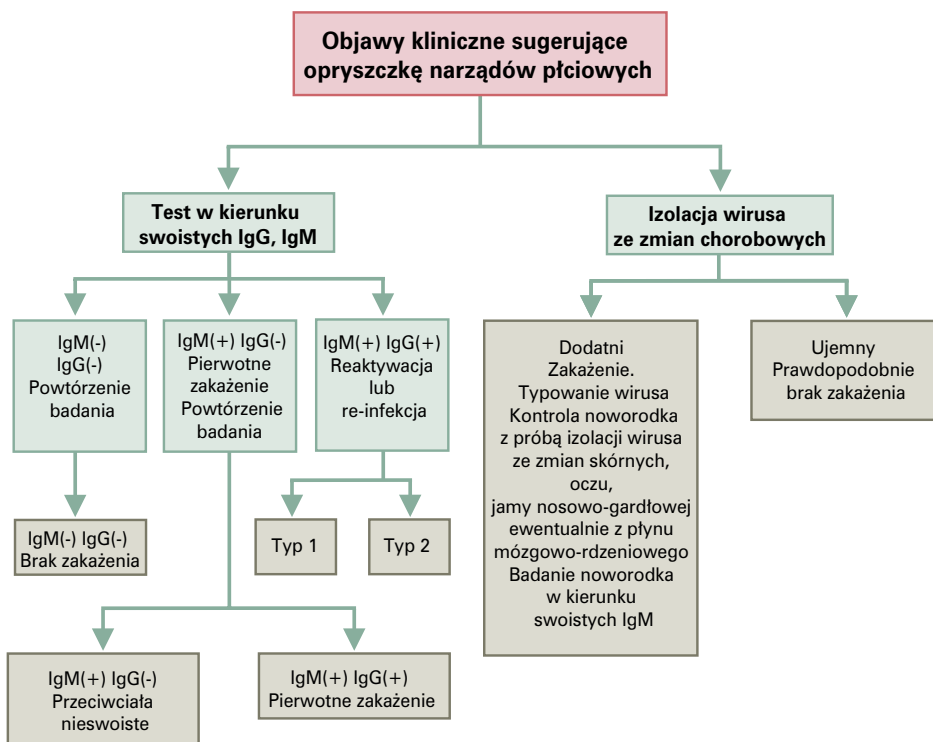
- opryszczkowe zapalenie jamy ustnej
- opryszczka wargowa (tzw. „zimno”)
- opryszczka oczna
- opryszczka narządów płciowych
- inne postaci opryszczki skórnej
- zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych
- opryszczkowe zapalenie mózgu
- choroba opryszczkowa noworodków

Standardowa terapia przeciwwirusowa zmniejsza objawy choroby HSV skracając tym samym czas utrzymywania się zmian chorobowych. Aktualnie nie ma możliwości wyleczenia z infekcji tym wirusem.

Zakażenie wirusem opryszczki pospolitej jest szczególnie niebezpieczne dla kobiet w ciąży z uwagi na poważne konsekwencje zdrowotne dotyczące płodu lub noworodka. Przełożyskowa transmisja HSV przed 20. tygodniem ciąży prowadzi do poronienia u 25% ciężarnych. Infekcja w późniejszym okresie ciąży może być przyczyną zakażenia wewnątrzmacicznego dziecka. Objawowa infekcja lub bezobjawowe pierwotne zakażenie przyszłej matki współlistnieją z ryzykiem porodu przedwczesnego i zaburzeniami rozwoju płodu. Reaktywacja zakażenia HSV u matki nie stwarza ryzyka uszkodzenia płodu. U noworodków, w przypadku każdej choroby pęcherzykowej należy podejrzewać zakażenie HSV.

ROZPOZNAWANIE ZAKAŻENIA HSV U KOBIET CIĘŻARNYCH I NOWORODKÓW

Standardowe metody potwierdzające zakażenie wirusem opryszczki pospolitej obejmują zarówno badania serologiczne jak i wirusologiczne. Niestety, w niektórych przypadkach rozpoznanie zakażenia HSV jest utrudnione głównie ze względu na naturalny przebieg zakażenia tym drobnoustrojem. Rozpoznanie nawracającego zakażenia czy reinfekcji HSV wymaga zastosowania specjalnych procedur i dlatego też najbardziej przydatne w diagnostyce jest badanie wymazu ze zmian skórnych zlokalizowanych w obrębie narządów płciowych. (Rycina 1)



Rycina 1. Proponowany schemat diagnostyczny zakażenia HSV u kobiet w ciąży



cobas® 6000
· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny

Izolacja wirusa możliwa jest w okresie 2–4 dni po pobraniu wymazu ze zmian opryszczkowych skóry, jamy gardłowej lub okolic narządów płciowych. Technika polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) umożliwia prawidłowe rozpoznanie zakażenia HSV zwłaszcza w przypadkach bez wyraźnej manifestacji klinicznej i braku izolacji wirusa z pobranego materiału biologicznego. Należy podkreślić, że przy podejrzeniu zakażenia HSV, badanie PCR może być techniką zbyt czułą aby określić rzeczywistą reaktywację; nadal nie ma też potwierdzeń, czy dodatni wynik polimerazowej reakcji łańcuchowej u chorego, u którego badanie wirusologiczne (izolacja) było negatywne świadczy o przebyłym zakażeniu. Interpretacja wyników metody PCR w odniesieniu do zakażenia HSV wymaga zatem ścisłej współpracy lekarza – praktyka i diagnosty.

W pierwotnym zakażeniu HSV, swoiste przeciwciała pojawiają się w okresie 4–7 dni po zakażeniu i osiągają szczyt po 2–4 tygodniach. Przeciwciała utrzymują się w surowicy krwi przez całe życie osoby zakażonej z niewielkimi wahaniami miana.

Swoiste IgM, które ujawniają się po pierwotnym zakażeniu HSV są także wykrywane w okresie nawracającej infekcji.

HSV-1 oraz HSV-2 posiadają powierzchniowe glikoproteiny (gG2 i gG1), które to są głównymi epitopami reagującymi ze swoistymi przeciwciałami. Możliwość reakcji krzyżowych przeciwciał z glikoproteinami innego typu wirusa może utrudniać rozpoznanie typu zakażenia w oparciu o testy serologiczne.



Analizator cobas e 411
· system
immunochemiczny
przeznaczony
dla średnich i dużych
laboratoriów

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń HSV i ocena statusu immunologicznego

HSV IgG	Podstawowe testy przesiewowe z wykorzystaniem techniki ELISA nie różnicują zakażenia HSV-1 i HSV-2. Wykorzystywane są przede wszystkim w rozpoznawaniu zakażenia pierwotnego u osoby uprzednio serologicznie ujemnej.
Swoiste testy HSV-IgG	Większość tych testów umożliwia rozpoznanie zakażenia określonym typem wirusa, stosuje się do tego celu metodę ELISA lub bezpośrednią immunofluorescencję. Nowe, specyficzne testy ECLIA umożliwiają różnicowanie HSV-2 z HSV-1 w oparciu o ocenę glikoproteiny gG1 i gG2. Przydatność tych testów jest szczególnie istotna w rozpoznawaniu zmian opryszczkowych narządów płciowych przy ujemnym wyniku badania wirusologicznego (izolacja wirusa) i ujemnym wyniku polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Technika <i>Western Blot</i> jest najbardziej czułą i swoistą techniką laboratoryjną umożliwiającą rozpoznanie zakażenia określonym typem wirusa opryszczki pospolitej. Z uwagi na koszty, możliwa jest do wykorzystania w określonych sytuacjach klinicznych; przeprowadzenie badania zajmuje od 2 do 5 dni.
HSV-IgM	Poszukiwanie swoistych przeciwciał przeciwko HSV w klasie IgM wykorzystuje metodę ELISA i immunofluorescencję. Z uwagi na przetrwały charakter zakażenia HSV oraz częste reaktywację, znajduje zastosowanie głównie w badaniu noworodków i dzieci. Ujemny wynik nie wyklucza zakażenia wirusem opryszczki pospolitej.
Izolacja wirusa	Wirus ma labilną strukturę, stąd uzyskanie ewentualnego pozytywnego wyniku wymaga odpowiedniego pobrania, przechowywania i transportu materiału biologicznego do pracowni wirusologicznej. Rzadko wykorzystywana w praktyce klinicznej.
Bezpośrednie wykrycie HSV	To szybka technika umożliwiająca wykrycie wirusa w wymazie ze zmian skórnych z wykorzystaniem techniki ELISA lub immunofluorescencji bezpośredniej. Jest jednak mniej czuła niż inne metody.
Wykrywanie materiału genetycznego HSV (HSV-DNA) metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR)	Wysoce czuła i swoista technika umożliwiająca potwierdzenie zakażenia zwłaszcza w próbkach zawierających niewielkie ilości wirusa. W zakażeniu ośrodkowego układu nerwowego, technika ta jest szczególnie przydatna.

PODSUMOWANIE

Wrodzone zakażenie HSV, podobnie jak i choroba opryszczkowa noworodków są spowodowane głównie zakażeniem typem 2 (HSV-2). Jednak w ostatnich latach, obserwuje się także opryszczkę narządów płciowych wywołaną zakażeniem wirusem typu 1 (HSV-1). Pierwotne zakażenie matki, podobnie jak i bezobjawowa infekcja ciężarnej stwarzają ryzyko poronienia czy zaburzeń rozwoju płodu; zakażenie dziecka podczas porodu może spowodować ciężką chorobę noworodka.

Prawidłowe rozpoznanie zakażenia HSV u matki oraz określenie fazy infekcji, zarówno u kobiety, jak i noworodka są niezbędne dla wdrożenia odpowiedniego, wczesnego leczenia. Izolacja wirusa ze zmian opryszczkowych narządów płciowych rozstrzyga o rozpoznaniu zakażenia. Badania serologiczne są przydatne, ale z uwagi na ewentualną obecność heterogennych przeciwciał nie spełniają w pełni swoich zadań diagnostycznych. Swoiste przeciwciała w klasie IgG powinny być oznaczone celem określenia potencjalnej infekcji nawrotowej u matki.

Izolacja wirusa, określenie antygenu lub materiału genetycznego HSV w badanym materiale biologicznym umożliwiają szybką, specyficzną diagnostykę reaktywacji zakażenia. Zakażenie noworodka powinno być rozpoznawane w oparciu o obraz kliniczny oraz badanie wirusologiczne lub badanie PCR. W przypadku zakażenia uogólnionego, przydatne jest wykorzystanie oceny IgM HSV.

Postępy w technologii PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), cz. I

POSTĘP W TECHNOLOGII RT-PCR

Poprawa swoistości

Siła technologii PCR leży w zdolności do wykrywania małych ilości sekwencji docelowej z ogromną czułością. Jako że czułość i swoistość metody PCR to parametry silnie ze sobą powiązane, wysiłki naukowców z RMD koncentrują się na poprawie swoistości technologii PCR, by móc w pełni wykorzystać jej potencjał. Mała swoistość amplifikacji może mieć zły wpływ na wykrywanie sekwencji docelowej, jeżeli w wyniku u nieswoistych reakcji powstaną produkty, których synteza zużyje składniki konieczne do przeprowadzenia właściwej reakcji PCR, takie jak startery czy deoksynukleotydtrifosforany (dNTPs).

Specyficzna amplifikacja jest niezwykle istotna w przypadku testów typu multiplex, choć swoistość w tym przypadku zwiększona jest na poziomie detekcji poprzez zastosowanie specjalnych sond, tym niemniej współzawodnictwo o składniki reakcji w przypadku niespecyficznej amplifikacji mogłoby niekorzystnie wpłynąć na efektywność amplifikacji sekwencji poszukiwanej, zwłaszcza w sytuacji, gdy liczba jej kopii w badanej próbce byłaby niewielka.

W dziale RMD opracowano kilka specjalnych udoskonaleń technologii RT PCR dotyczących:

- Enzymów typu „hot start”
- Inżynierii chemicznej kwasów nukleinowych
- Parametrów temperatury PCR
- Specyfiki genotypowej

Metody te, opracowane i/lub wykorzystywane przez naukowców z RMD, stały się złotym standardem w technologii RT PCR, objęte są licencjami i na zasadzie licencji udostępniane innym firmom z branży diagnostyki molekularnej.

Ulepszenia chemiczne i enzymatyczne

Naukowcy firmy Roche odkryli i opracowali wiele podstawowych technologii, które umożliwiły badanie kwasów nukleinowych, a w szczególności chodzi tu o samą technologię PCR, polimerazę Taq, systemy detekcji w RT PCR. ⁽¹⁻⁸⁾ Opracowanie technologii RT PCR z wykorzystaniem barwnika i sondy do generowania specyficznego sygnału detekcji podczas odbywającej się amplifikacji było przełomowym krokiem, który pozwolił na analizę ilościową kwasów nukleinowych. Aspekty chemiczne i enzymatyczne starterów i sond w celu opracowania jeszcze bardziej czułych, specyficznych i prostych do przeprowadzenia testów w wersji automatycznej i złożonej jako testy typu multiplex są ciągle udoskonalane.

Wybór właściwych celów dla starterów

Wybór sekwencji docelowych dla starterów i sond wykorzystywanych w reakcjach PCR jest poprzedzony dokładnymi analizami sekwencji genomów wirusowych i bakteryjnych dostępnych w bazach danych, a także badaniami sekwencji dla poszczególnych genotypów i subtypów. W przypadku RNA wirusa HIV-1 zestawy starterów i sond zostały wybrane dopiero po dokładnym przeszukaniu i analizie wszystkich dostępnych baz do oceny przydatności potencjalnych regionów genomu wirusa HIV-1 do amplifikacji PCR. Wobec rozbudowujących się ciągle baz danych o sekwencjach genomowych, coraz dokładniejszemu zdefiniowaniu różnych genotypów, jak również miejsc odpowiednich dla rekombinacji, możliwe jest, że w przyszłości oferowane będą testy z jeszcze lepiej dobranymi sekwencjami docelowymi.

*Opracowanie złotego standardu dla real-time PCR
Naukowcy z Działu Diagnostyki Molekularnej Roche (RMD) rozwijają i udoskonalają technologię łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), zarówno reakcji standardowej PCR oraz PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Połączyliśmy innowacyjne techniki biochemiczne z tym, co najlepsze w technologii PCR, by uzyskać najlepsze połączenie – prosty test z pełną automatyzacją.*

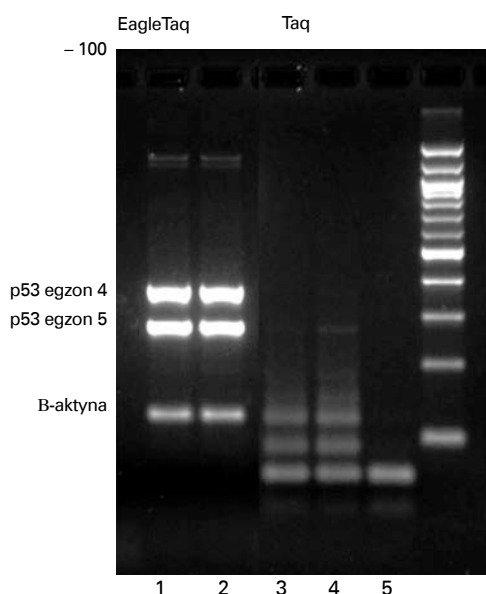


**Analizator cobas
TaqMan 48**

· automatyczna
amplifikacja PCR
i detekcja w czasie
rzeczywistym (real time
PCR) dwóch testów
równocześnie

**Poprawa specyficzności multipleksowej
amplifikacji fragmentów genu p53
z wykorzystaniem polimerazy EagleTaq
Rysunek 1**

Górne prążki – amplicony egzonów 4
(365 par zasad) i 5 (272 pary zasad) genu p53
Dolny prążek – β -aktyna jako kontrola wewnętrzna
(117 par zasad)
Ścieżki 1 i 2 – polimeraza EagleTaq
Ścieżki 3 i 4 – polimeraza Taq
Ścieżka 5 – kontrola bez polimerazy
Ścieżka 6 – MW marker wielkości



polimerazy DNA chemicznie
zmodyfikowane w grupie
 ϵ -aminowej łańcuchów bocznych
lizyny.

Ta odwracalna modyfikacja
kwalencyjna pozwala pozostać
enzymowi w stanie nieaktywnym
w niskich temperaturach,
kiedy to najczęściej dochodzi
do powstawania nieswoistych
produktów PCR. W odpowiednio
wysokiej temperaturze element
warunkujący kwalencyjną
modyfikację ulega hydrolizie, co
reaktywuje polimerazę i umożliwia
rozpoczęcie reakcji PCR. Pionierski
wynalazek „hot start” wydatnie
poprawił specyficzność amplifikacji
(Rys. 1).

Projektowanie testów o wysokiej tolerancji na zmienność sekwencyjną

Zmienność sekwencyjna w próbkach biologicznych stanowi duże wyzwanie dla technologii
w diagnostyce *in vitro* wykorzystujących techniki hybrydyzacji kwasów nukleinowych.
Naukowcy firmy Roche opracowują wysokiej jakości testy wykazujące tolerancję na znaną
i nieznaną jeszcze zmienność sekwencyjną. Przykładem mogą być rozwiązania, które pozwalają
ominąć problem zmienności sekwencyjnej.

POPRAWA SPECYFICZNOŚCI

1. Enzymy z funkcją „hot start”

W celu zwiększenia specyficzności testów w wielu z nich zastosowano technologię
„hot start”, gdzie najistotniejsze komponenty reakcji są nieaktywne lub niedostępne do
momentu uzyskania odpowiednio wysokiej temperatury reakcji. Głównym czynnikiem
pozwalającym w ten sposób kontrolować niespecyficzną amplifikację są kowalencyjne
modyfikacje w polimerazach DNA ^(9,10) (TaqGold, EagleTaq, Z05Gold). Enzymy te to

2. Nowa metoda uzyskania efektu „hot start” z wykorzystaniem aptamerów

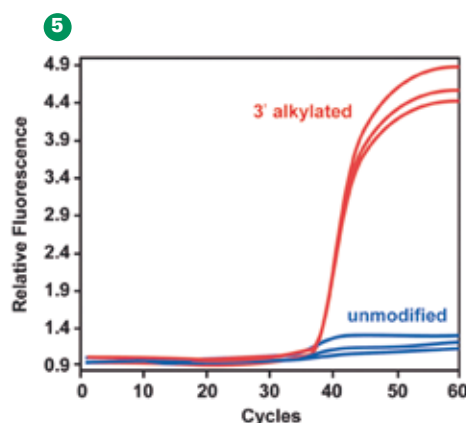
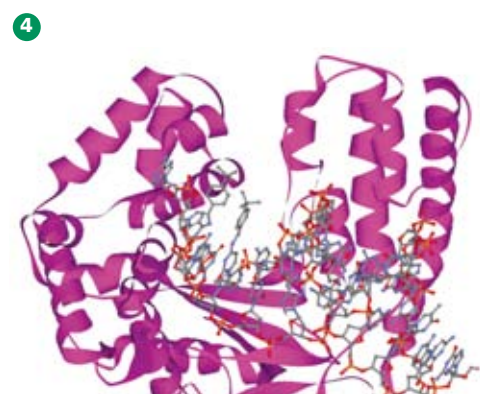
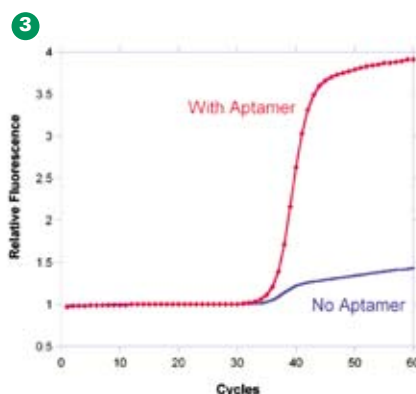
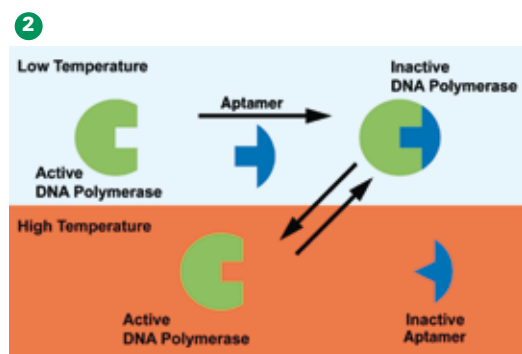
Inną metodą przeprowadzenia reakcji w wersji „hot start” jest zastosowanie aptamerów.
Aptamery to małe oligonukleotydy, którym unikatowa struktura drugo- i trzeciorzędowa
umożliwia bardzo efektywne wiązanie się do miejsc aktywnych enzymów w niskich
temperaturach. W wyższych temperaturach struktura drugo- i trzeciorzędowa aptameru
ulega denaturacji, co pozwala na jego odłączenie od kompleksu enzymatycznego (Rys. 2).
We współpracy z naukowcami z firmy NeXsar Pharmaceuticals specjaliści firmy Roche
opracowali aptamery, które silnie wiążą i hamują polimerazy zwykle wykorzystywane
w reakcjach PCR. Wcześniej zidentyfikowane aptamery zostały dodatkowo
zmodyfikowane w taki sposób, aby osiągnąć optymalną temperaturę hamowania
aktywności polimerazy. W przeciwieństwie do kwalencyjnie modyfikowanych enzymów,
aptamery nie wymagają w celu aktywacji wydłużonego czasu inkubacji w wysokiej
temperaturze (np. 10 min. w 95°C). Jest to niezwykle istotne przy pracy z wrażliwymi na
działanie temperatury cząsteczkami RNA np. w przypadku wirusów HIV lub HCV.

Obie metody wykorzystania efektu „hot start” – zarówno przez zastosowanie modyfikacji kowalencyjnych enzymów, jak i użycie aptamerów, uczyniły te testy niezwykle odpornymi na zakłócenia, co z kolei umożliwiło ich automatyzację (Rys. 3).

3. Modyfikacje chemiczne starterów dla zwiększenia swoistości amplifikacji

Dodatkową metodą zapobiegania powstawaniu niespecyficznych produktów amplifikacji są kowalencyjne modyfikacje końców 3' starterów. Poprzez umieszczenie bocznych grup alkilowych w zasadzie azotowej zlokalizowanej w dużej bruzdzie cząsteczki w obrębie lub w pobliżu końca 3' startera można poprawić specyficzność reakcji PCR ^(11,12). Poprzez dodanie takiego „ładunku” do końca 3' startera, modyfikacja z użyciem grup alkilowych powoduje, iż dimery starterów praktycznie nie powstają (Rys. 4).

Prawidłowo przyłączone do amplifikowanej nici zmodyfikowane startery mogą być wydłużane tak samo efektywnie jak startery niezmodyfikowane.



PCR z efektem „hot start” – specyficzna modyfikacja z wykorzystaniem aptameru

Rysunek 2

System „hot start” z wykorzystaniem aptameru. W niskiej temperaturze aptamer przybiera strukturę „szpilki do włosów”, która wiąże się i dezaktywuje polimerazę DNA, zapobiegając amplifikacji. W wysokiej temperaturze struktura „szpilki do włosów” ulega modyfikacji a cząsteczka aptameru odłącza się od polimerazy, umożliwiając amplifikację.

Rysunek 3

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzona dla materiału genetycznego wirusa HIV z wykorzystaniem polimerazy DNA Z05 w obecności oraz przy braku aptameru, zakończona 6-godzinną inkubacją w temp. 37°C dla sprawdzenia stabilności produktów reakcji. Wyraźnie widoczne polepszenie parametrów reakcji po zastosowaniu aptameru (wyższa wydajność i wartość Ct).

Alkilowane startery – struktura

Rysunek 4

Model strukturalny zmodyfikowanego startera połączanego z polimerazą Taq. Miejsca obciążeniowe w dużej bruzdzie DNA z dala od miejsca aktywnego enzymu. Wydłużanie zmodyfikowanego startera połączanego z matrycą jest niezakłócone. Ewentualne, wcześniej utworzone dimery starterów wg tego modelu nie mogą być wydłużane ze względu na przeszkody steryczne dwóch grup tert-butył-benzylowych zarówno na zasadach należących do startera, jak i do matrycy. Prowadzi to do znacznego wzrostu specyficzności i czułości reakcji.

Krzywe reakcji w systemie TaqMan® z wykorzystaniem zmodyfikowanych i niezmodyfikowanych starterów

Rysunek 5

Wzrost efektywności amplifikacji i detekcji RNA wirusa HCV w systemie TaqMan® z wykorzystaniem alkilowanych na końcu 3' starterów. Czerwona krzywa ukazuje przebieg reakcji z wykorzystaniem starterów zmodyfikowanych. Niebieska krzywa ukazuje przebieg reakcji bez zastosowania zmodyfikowanych starterów.

Alkilacja na końcu 3' startera zwiększa specyficzność reakcji PCR poprzez zapobieganie tworzeniu się dimerów starterów, oraz poprzez zapobieganie amplifikacji sekwencji innych niż docelowe. Cechy te są szczególnie istotne dla reakcji typu multiplex. Zwiększona swoistość osiągnięta poprzez enzymy czy aptamery umożliwiające reakcję typu „hot start”, a także poprzez wykorzystanie alkilowanych starterów, pozwala na zwiększenie czułości PCR oraz zwiększa odporność amplifikacji na błędy w obrębie dynamiki reakcji. Ograniczenie artefaktów PCR (np. powstawania dimerów starterów), które ma miejsce wraz z wprowadzaniem nowych rozwiązań technologicznych, jest niezwykle znaczące (Rys. 5).

PROJEKTOWANIE TOLERANCJI NA WYKRYWANIE ZMIENNOŚCI SEKWENCYJNEJ

Zjawiskiem przeciwnym do specyficzności jest zdolność do wykrywania sekwencji docelowych nie pasujących dokładnie (*mismatch*) do starterów lub sondy. Genomy wirusowe, szczególnie w przypadku RNA, bardzo szybko ewoluują, np. wirus HIV-1 grupy M posiada 9 podtypów. Wynikiem tego jest powstawanie populacji wariantów wirusa ze znaczącą heterogennością sekwencji. Stanowi to wyzwanie dla jakiegokolwiek testu polegającego na wykrywaniu kwasów nukleinowych, ponieważ różnorodność sekwencji w rejonie wiązania starterów/sond może wpływać na zdolność wykrywania wszystkich wariantów wirusowych w danym teście. Opracowano szereg strategii dla osiągnięcia tolerancji testu na zmiany będące wynikiem mutacji punktowych bez utraty swoistości testu.

1. Precyzyjne dopasowanie profili temperaturowych dla osiągnięcia tolerancji na mutacje punktowe

Naukowcy z RMD zaprojektowali unikalne warunki profili temperaturowych reakcji, które współpracują z odczynnikami do reakcji w celu zoptymalizowania zarówno czułości, jak i swoistości testów RT PCR. Poprzez zastosowanie nowatorskiej koncepcji precyzyjnie dopasowanych profili temperaturowych, pożądana całościowa równowaga pomiędzy specyficznością reakcji a zdolnością do wykrywania wszystkich genotypów może zostać osiągnięta.

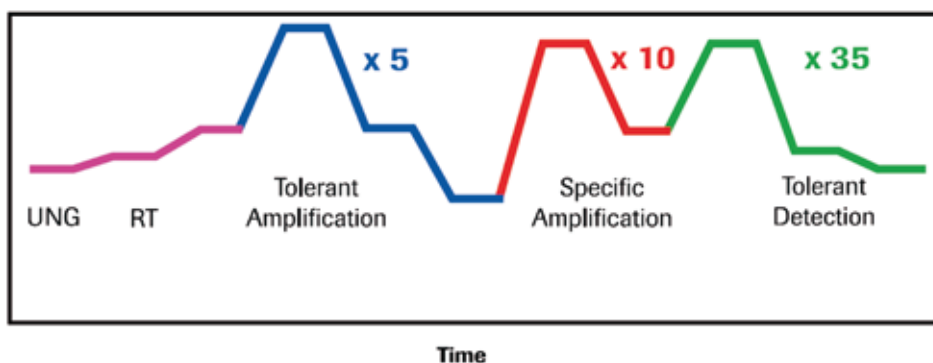
Precyzyjne dopasowanie profili temperaturowych przełamuje koncepcję zunifikowania parametrów reakcji i optymalizuje je w oddzielnych sekcjach dla osiągnięcia pożądanego parametrów każdej z faz reakcji PCR.

Cykle reakcji z niskimi temperaturami poprawiają tolerancję na mutacje punktowe, podczas gdy fazy z wyższymi temperaturami zwiększają specyficzność a w związku z tym i czułość (Rys. 6).

Precyzyjne dopasowanie profili temperaturowych dla osiągnięcia tolerancji na mutacje punktowe

Rysunek 6

Warunki temperaturowe cykli reakcji PCR są zmodyfikowane w ten sposób, że pożądanego efektu każdej z faz reakcji PCR jest osiągany dzięki zastosowanym specyficznym warunkom. Po etapie „sterylizacji” UNG, rozpoczyna się etap odwrotnej transkrypcji (RT) w niższej temperaturze warunkującej odporność na mutacje punktowe (tolerant). Temperatura ta pozostaje jednakże wystarczająco wysoka by „stopić” drugorzędową strukturę kwasu nukleinowego. Następnie temperatura jest podnoszona, a wraz z nią wzrasta specyficzność reakcji. Amplifikacja następuje w odrębnych fazach rozpoczynając się kilkoma cyklami temperaturowymi, w których na etapie wydłużania stopniowo obniżana jest temperatura, co umożliwia wydłużanie matrycy niedokładnie dopasowanej do starterów. Kolejna faza amplifikacji następuje w jednorodnej i ściśle dopasowanej temperaturze tak, iż tylko specyficzne produkty mogą być wydajnie amplifikowane. Końcowa faza amplifikacji następuje w relatywnie niskich temperaturach, co umożliwia wydajną hybrydyzację i hydrolizę sond nawet w przypadku genotypów ze zmiennością punktową.

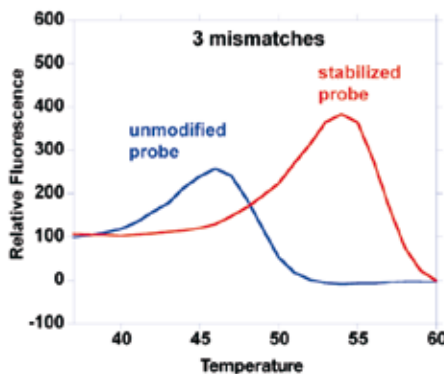
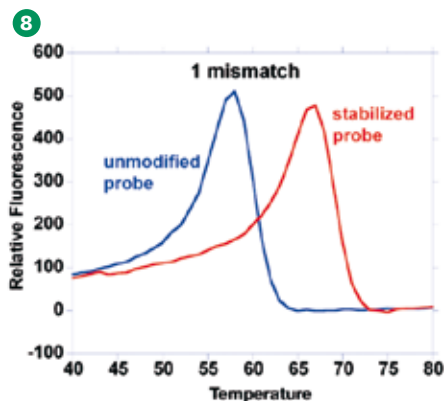
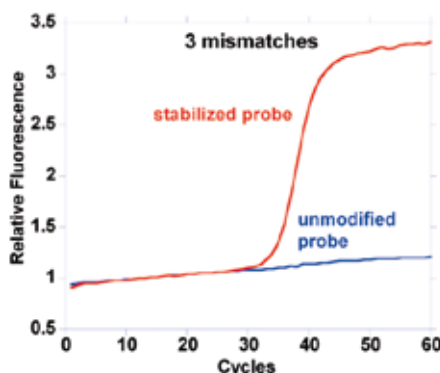
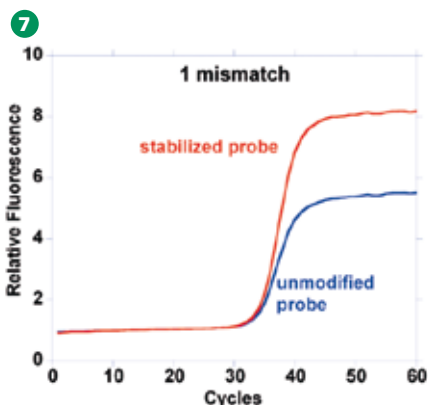


2. Modyfikacje chemiczne sond dla osiągnięcia tolerancji na mutacje punktowe

Tolerancja na mutacje punktowe dla każdego testu może być dodatkowo zwiększona poprzez włączenie analogów nukleotydowych. Analogi te poprawiają stabilność termodynamiczną podwójnej struktury DNA, mogą ponadto wydatnie zwiększać temperaturę topnienia struktury hybrydowej sonda-matryca. W ten sposób dzięki zmodyfikowanym zasadom uzyskać można dodatkową stabilność hybrydy i ominąć problem niestabilności połączenia sondy z sekwencją zawierającą mutacje punktowe. Wykorzystanie takich modyfikacji pozwala ponadto na stosowanie względnie krótkich sond, które pokrywają mniejszą przestrzeń w obrębie sekwencji docelowej, co zmniejsza prawdopodobieństwo przyłączenia sondy do obszaru zmutowanego w obrębie sekwencji docelowej.

Stopień stabilizacji nadany przez chemiczne modyfikacje jest wystarczający by ominąć problem niestabilności kompleksu sondy połączonej z sekwencją zawierającą mutacje punktowe. Technika ta została zoptymalizowana w połączeniu z dostosowaniem profili temperaturowych PCR, jak zostało to opisane powyżej.

II cz. w następnym numerze



Zastosowanie stabilizowanych sond TaqMan® warunkujących tolerancją na mutacje punktowe

Rysunek 7

Porównanie detekcji w systemie TaqMan® dla subtypów wirusa HIV-1 z zastosowaniem niezmodyfikowanych oraz zmodyfikowanych sond. W tym przypadku sonda zmodyfikowana zawiera 21 modyfikacji stabilizujących w postaci 5-metylo-deoksycytyny lub 5-propynylo-deoksurydyny.

Zastosowanie zmodyfikowanej sondy pozwala na efektywną detekcję nawet w przypadku znacznie zmodyfikowanego podtypu. Nasze sondy zostały dopasowane w ten sposób by zapewnić zarówno wysoką specyficzność, jak i tolerancję na mutacje punktowe w celu wykrycia różnych genotypów.

Rysunek 8

Porównanie krzywych topnienia niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych sond dla tych samych modyfikacji jak opisano przy Rys. 7.

W przypadku sondy modyfikowanej zastosowanie 5-metylo-cytyny powoduje dodatkową stabilizację o około 0,4°C na każde podstawienie. 5-propynylo-deoksurydyna może być zastosowana jako zamiennik tymidyny w sondach z uzyskaniem podobnego wzrostu stabilizacji sondy. Najbardziej „agresywnym” czynnikiem stabilizującym jest 5-propynylo-deoksycytyna, dająca efekt stabilizacji sondy o 0,9°C wyższy w porównaniu do zwykłej cytidyny. Poprzez rozważne zastosowanie zasad stabilizujących wartość T_m sondy może być zwiększona nawet o 10°C.

Co to są wahania glikemii?

„Skuteczność stosowanego schematu terapii winna być monitorowana tak często, jak trzeba, by ukierunkować leczenie na osiągnięcie docelowych wartości glikemii poposiłkowej”.¹¹

WAHANIA GLIKEMII – ZNACZENIE NOWO POWSTAŁEJ HIPOTEZY

Hiperglikemia poposiłkowa (postprandial hyperglycemia, PPHG) jest znanym niezależnym czynnikiem ryzyka progresji cukrzycy. Jednakże jest ona tylko jednym z elementów zjawiska, budzącego dziś podejrzenia o wywoływanie nawet bardziej szkodliwych skutków – wahań glikemii. Ale co to są „wahania glikemii”?

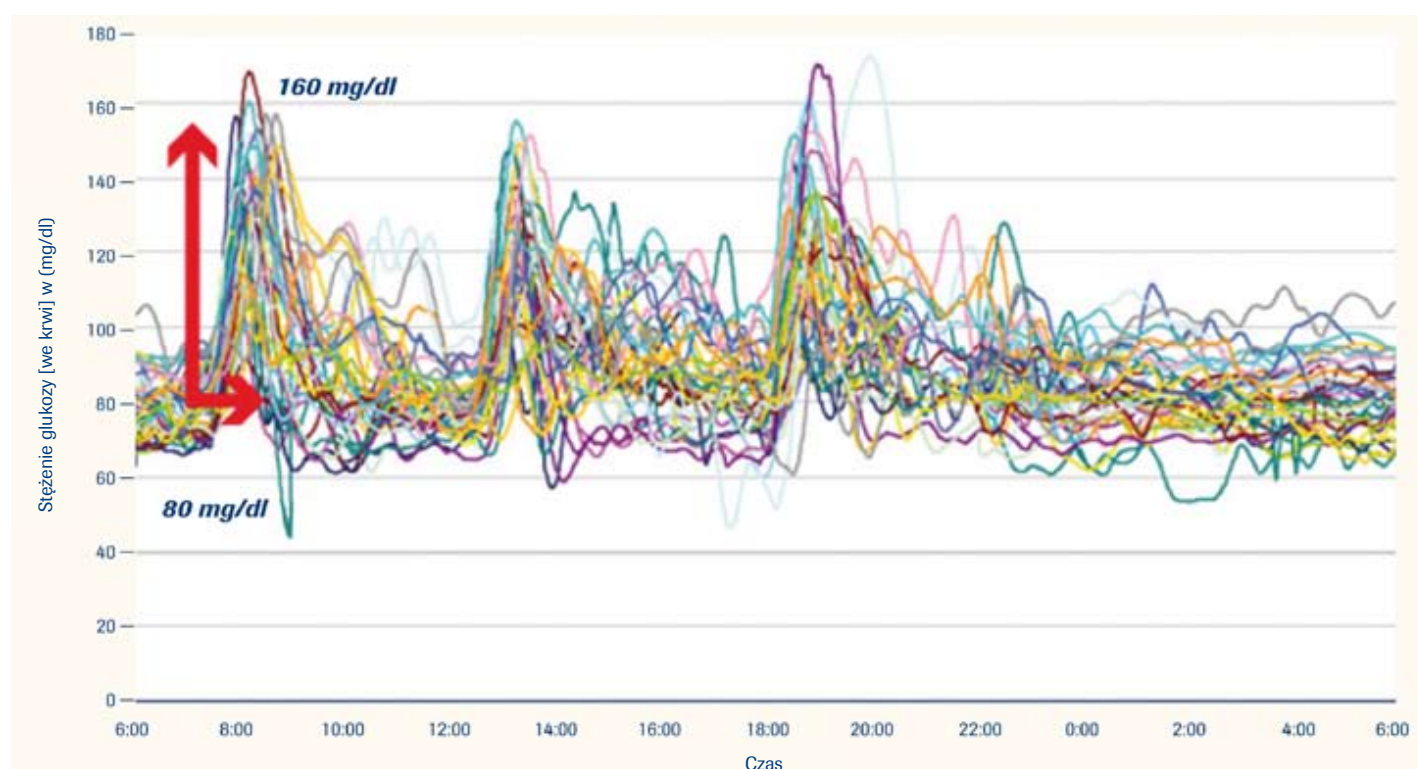
WAHANIA GLIKEMII – ZMIENNOŚĆ POZIOMU GLUKOZY WE KRWI PRZEKRACZAJĄCA ZAKRES NORMY

„Zmienność glikemii” definiuje się jako wahania poziomu glukozy we krwi poniżej i powyżej zakresu normy (prawidłowa glikemia na czczo $<5,6$ mmol/L [100 mg/dl]; prawidłowa glikemia 2 h po posiłku $<7,8$ mmol/L [140 mg/dl])¹. Obejmuje to zarówno epizody hipoglikemii występujące np. po wysiłku fizycznym, jak i okresy hiperglikemii np. po posiłkach. Do wystąpienia wahań glikemii przyczynia się wiele czynników, jak pora dnia, stan zdrowia, poziom stresu. Co więcej, wpływ tych czynników może być różny u poszczególnych osób (zmienność międzypersoniczna) i u tej samej osoby z dnia na dzień.

HIPERGLIKEMIA POPOSIŁKOWA – WAŻNY ELEMENT WAHAŃ GLIKEMII

Wzrost poziomu glukozy we krwi występujący po posiłku nazywamy „hiperglikemią poposiłkową” (PPHG); jest to tylko jeden z elementów wahań glikemii jako całości (patrz wzrost glikemii na ryc.1 o godz.8.30, 13.30 i 19.30, przypuszczalnie następujący po śniadaniu, obiedzie o kolacji), lecz został on poddany dokładnej analizie. Badania eksperymentalne wykazały, że PPHG jest istotnym czynnikiem progresji cukrzycy. Badania epidemiologiczne ujawniły, że wykazuje ona silny związek z miażdżycą naczyń,

Ryc. 1. Wahania glikemii u osób bez cukrzycy



z czym wiąże się znamienne wyższe ryzyko wystąpienia choroby wieńcowej lub zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych.^{2,3,4,5,6} Metaanaliza Coutinho i wsp. potwierdziła również związek PPHG z ryzykiem względnym incydentów sercowo-naczyniowych.⁷ W końcu nawet badania interwencyjne wykazały, że zmniejszenie PPHG powoduje redukcję „stresu oksydacyjnego”, co oznacza, że organizm wytwarza mniej reaktywnego tlenu, uszkadzającego komórki i cząsteczki. Poza tym spadek PPHG korelował ze zmniejszeniem grubości błony środkowej naczyń krwionośnych, będącej wskaźnikiem wczesnej fazy miażdżycy.^{8,9} Ponadto Kovatchev i wsp. ujawnili, że istnieje możliwość kontrolowania PPHG przy użyciu pramlintydu, analogu amyliny (małego hormonu peptydowego, uwalnianego przez trzustkę po posiłku wraz z insuliną). W porównaniu z placebo pramlintid znamienne obniżał częstość i nasilenie poposiłkowych wahań glikemii. Zatem są to pierwsze dane ukazujące możliwość interwencji terapeutycznej w tym zjawisku.¹⁰ Z tego właśnie powodu Międzynarodowa Federacja Cukrzycy (IDF) opublikowała wytyczne postępowania z poposiłkową glikemią, stwierdzając w nich, że PPHG jest niezależnym czynnikiem ryzyka.

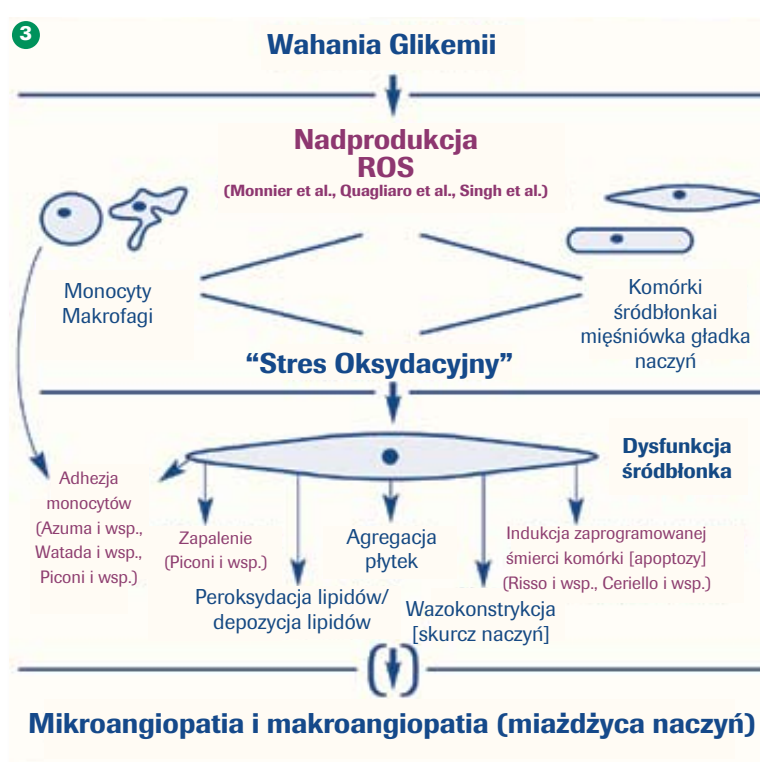
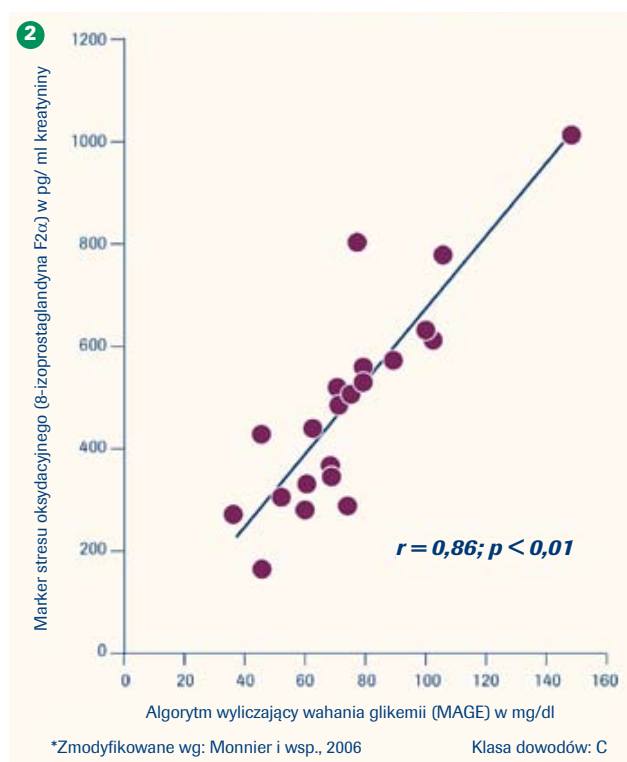
BADANIA EKSPERYMENTALNE NAD WAHANIAM GLIKEMII – ZACHĘCAJĄCE WYNIKI

Ponieważ hiperglikemia poposiłkowa jest ważnym elementem wahań glikemii, wydaje się logiczne, że jako całość mogą one prowadzić do niebezpiecznych skutków, podobnych jak te wywoływane przez PPHG. Istotnie, dane doświadczalne są zachęcające: w komórkach śródbłonna ekspozycji na wysokie stężenia glukozy w sposób przerywany dochodziło do znamienego „ułatwienia” zaprogramowanej śmierci komórki (tzw. apoptoza, przyp. od tłumacza), w porównaniu z komórkami

„Najpierw wyrównaj hipoglikemię, następnie glikemię na czczo, następnie wzrosty glikemii po posiłkach, i zredukuj wahania glikemii na tyle, na ile jest to możliwe”.²⁰

Ryc. 2. Linearna zależność między wartościami markera stresu oksydacyjnego (8-izoprostaglandyny F_{2α}) i algorytmu wyliczającego wahania glikemii (MAGE, Mean Amplitude of Glucose Excursions = średnia amplituda wahań glikemii)

Ryc. 3. Potencjalny mechanizm rozwoju mikroangiopatii indukowanej przez wahania glikemii i „stres oksydacyjny”



eksponowanymi na stałe wysokie stężenia glukozy³. Ponadto wahania glikemii wywołują stres oksydacyjny bardziej specyficznie, niż przewlekłe się utrzymująca hiperglikemia.^{47,12} Wykazano na przykład, że jeden ze specyficznych markerów stresu oksydacyjnego (8-izoprostaglandyna F2a) jest produkowany w nadmiarze u osób z cukrzycą typu 2. Im wyższy poziom markera, tym większa zmienność glikemii (Ryc. 2)¹³. W kilku pracach ujawniono, że wahania glikemii poza indukcją stresu oksydacyjnego wywołują jeszcze i inne czynniki, istotne dla rozwoju mikro- i makroangiopatii (miażdżycy naczyń) (Ryc. 3). Wzmagają one na przykład syntezę „cząsteczek adhezyjnych”, białek znajdujących się na powierzchni komórek, zaangażowanych w wiązanie leukocytów z innymi komórkami, np. śródbłonna naczyń.¹⁴ Adhezja leukocytów do komórek śródbłonna jest jednym z najwcześniejszych zjawisk w miażdżycy¹⁵; wykazano, że znamienne bardziej sprzyjają jej wahania glikemii, niż stałe podwyższony poziom glukozy.^{8,16} Co więcej, wahania poziomu glukozy wywołują zapalenie, stwierdzone w płytkach miażdżycowych¹⁴ i indukują wiele innych szkodliwych czynników, uważanych za inicjujące progresję mikro- i makroangiopatii.

KLINICZNE ZNACZENIE WAHAŃ GLIKEMII – PIERWSZE OBIECUJĄCE WYNIKI

Kilku autorów udowodniło, że zwiększone wahania glikemii związane są ze wzrostem odsetków chorobowości i umieralności u będących w stanie krytycznym pacjentów pediatrycznych, chirurgicznych i ogólnych oddziałów intensywnej terapii.^{17,18,19} To są jednak dopiero pierwsze dane wzmacniające hipotezę o klinicznym znaczeniu wahań glikemii. Obecnie mówi się o nich jako o „motorze” leczenia cukrzycy; Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ADA) w swoich wytycznych zaleca następujące etapy korygowania terapii:

WAHANIA GLIKEMII – BEZPOŚREDNI WPŁYW NA PROGRESJĘ CHOROBY JESZCZE NIEUDOWODNIONY

Jednakże chwilowo brak jeszcze danych udowadniających bezpośredni efekt kliniczny wahań glikemii. Podczas gdy istnieje solidna baza danych naukowych odnośnie hiperglikemii poposiłkowej, potrzeba jeszcze prospektywnych randomizowanych badań, by potwierdzić nowo powstałą hipotezę o indukowaniu progresji zmian mikro- i makroangiopatycznych w cukrzycy przez wahania glikemii (Ryc. 4). Ponadto trzeba jeszcze odpowiedzieć na wiele zasadniczych pytań dotyczących wahań glikemii. Jak należy je dokładnie zdefiniować? Czy można określić ich poziom, zakres i szybkość, istotne dla progresji choroby? Czy, jak opisano powyżej, prowadzą one do niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczynowych? Jeśli tak, jakie interwencje terapeutyczne będą odpowiednie i czy będą one w stanie poprawić rokowania kardiologiczne?

WAHANIA GLIKEMII JAKO CZYNNIK RYZYKA PROGRESJI CHOROBY – PRO I CONTRA

Choć powyższych kwestii jeszcze nie rozwiązano, argumenty przemawiające za uznaniem wahań glikemii za niezależny czynnik progresji cukrzycy przeważają nad kontrargumentami (Ryc. 5). Ostatecznie można stwierdzić, że wahania glikemii to zaburzenie regulacji glikemii, złożone z epizodów wzrostu poziomu glukozy powyżej zakresu normy i jego spadku poniżej tego zakresu. Badania eksperymentalne wykazały, że wahania glikemii indukują różne czynniki uważane za inicjujące progresję makro- i mikroangiopatii cukrzycowej. Ponadto wahania glikemii wykazują znamienny związek z chorobowością i umieralnością krytycznie chorych pacjentów. Jednakże chwilowo brak

jeszcze danych udowadniających bezpośredni efekt kliniczny wahań glikemii. Należy rozpocząć prospektywne randomizowane badania mające na celu ocenę tego efektu oraz określić wartości graniczne wahań glikemii. Znaczenie kliniczne wahań glikemii nadal jest tylko hipotezą, lecz argumenty przemawiające za uznaniem wahań glikemii za niezależny czynnik progresji cukrzycy przeważają nad kontrargumentami. Zatem jesteśmy w drodze...

Piśmiennictwo dostępne w redakcji.

Ryc. 4. Podsumowanie opublikowanych danych naukowych na temat hiperglikemii poposiłkowej i wahań glikemii



Ryc. 5. Podsumowanie „za” i „przeciw” wahaniom glikemii jako niezależnemu czynnikowi ryzyka progresji choroby w cukrzycy

"Za"	"Przeciw"
- Colette C and Monnic M (2006/7)21,22 - ostre wahania poziomu glukozy to zaburzenia glikemii prowadzące do stresu oksydacyjnego i powikłań cukrzycy - w badaniach interwencyjnych powinno się obrać za cel zniesienie ostrych wahań glikemii - Hirsh IB and Brownlee M (2005)24 Zmienność glikemii może być ważnym, lecz niedoszacowanym mechanizmem prowadzącym do przyspieszenia rozwoju mikro- i makroangiopatii. - Ceriello A i wsp. (2008)12 Zmienność glikemii powoduje stres oksydacyjny i dysfunkcję nabłonka, "dwa kluczowe czynniki ułatwiające rozwój powikłań sercowo-naczyniowych w cukrzycy" - Kilpatrick Es i wsp. (2008) W przeciwieństwie do danych z DCTT, długotrwałe wahania glikemii wydają się stanowić czynnik odgrywający rolę w rozwoju retinopatii i nefropatii.	(Gordin D i wsp. (2008)25 Całkowita ekspozycja na podwyższone stężenia glukozy jest ważniejszym czynnikiem rozwoju makroangiopatii niż wahania glikemii per se. - Wentholt IME i wsp. (2008)25 Nie ma żadnej zależności pomiędzy wahaniami glikemii a podwyższonymi poziomami markerów stresu oksydacyjnego u chorych z cukrzycą typu 1.

II Forum IVD

1 Od lewej: Jürgen Schulze, Philippe Jacon, Christian Parry, u góry z lewej Benny Ons

2 Adam Fronczak, wiceminister zdrowia RP

3 Andrzej Banaszkiewicz, prezes IPDDL

4 Jürgen Schulze, prezydent EDMA

5 Benny Ons, treasurer EDMA

6 Od lewej: Justyna Kurcyn, dyrektor generalny Sysmex Polska i Jürgen Schulze



COBAS i LIFE NEEDS ANSWERS są
znakami towarowymi należącymi do Roche
©2011 Roche Diagnostics

Nasz adres:
Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdynskie 6B
01-531 Warszawa

centrala: tel. 0-22/481 55 55, 56
faks 0-22/481 55 99
call center: tel. 0-22/481 54 54
e-mail: dia.callcenterpl@roche.com

obsługa klienta: tel. 0-22/481 54 00-05
faks 0-22/481 55 96
e-mail: polska.diagnostics@roche.com
internet: www.roche.pl

Opracowanie techniczne: Elżbieta Czarnacka
DTP: Iwona Domagała-Pławny
Przygotowanie do druku i druk:
AR-W Arkadiusz Grzegorzczak, www.grzeg.com.pl