

## Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji

### The polymerase chain reaction – a new research and diagnostic method in virology

Mario Poljak\*, Tatjana Avšič-Županc\*\*, Katja Seme\*\*\*

Descriptorji  
polimerazna verižna reakcija – metode  
virusne bolezni – diagnostika

Descriptors  
polymerase chain reaction – methods  
viral diseases – diagnosis

**Izvleček.** Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je razmeroma nova metoda sinteze nukleinskih kislin in vitro, s katero lahko v kratkem času pomnožimo določeni odsek DNA v velikem številu kopij. Čeprav je metoda stara šele nekaj let, je danes že nepogrešljiva na številnih področjih biomedicinskih raziskav. Namen našega članka je predstaviti tako teoretične osnove PCR in načine optimizacije metode kot tudi najbolj pogoste probleme in težave, ki se pojavljajo pri izvedbi PCR, ter ukrepe za njihovo odpravo oz. zmanjšanje. Na kratko so prikazane tudi današnje možnosti uporabe PCR v raziskovanju in diagnostiki virusnih okužb.

**Abstract.** The polymerase chain reaction (PCR) is an in vitro method which uses enzymatic synthesis to amplify, in an exponential manner, specific DNA or RNA sequences. Although it has been available for only a few years, PCR technology is already finding widespread application in biomedical research. This article presents a broad overview of the principles of PCR, summarizes some of the application problems, and describes some measures taken to overcome them. The main applications of PCR-based assays in virology are also discussed.

## Uvod

Verižna reakcija sinteze DNA s pomočjo temperaturno obstojne DNA polimeraze ali verižna reakcija polimerizacije ali verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) je relativno nova metoda sinteze nukleinskih kislin in vitro, s katero lahko v kratkem času pomnožimo določeni odsek DNA v velikem številu kopij. Od odkritja metode leta 1983 (Kary Mullis, Nobelova nagrada za kemijo, leto 1993) in prve objave leta 1985 (1) je bilo do danes objavljenih že približno 20.000 znanstvenih in strokovnih prispevkov, ki opisujejo različne biomedicinske raziskave, v katerih je bila poleg ostalih raziskovalnih metod uporabljena tudi metoda PCR (2, 3). Približno petina teh raziskav je s področja virologije (3).

Kljub temu da metodo poznamo šele nekaj let, večina raziskovalcev meni, da PCR že predstavlja metodo, brez katere moderno raziskovalno delo v virologiji skoraj ni mogoče (2, 4). V nekaterih viroloških laboratorijih PCR danes uporabljajo tudi kot diagnostično metodo.

PCR že nekaj časa uspešno uporabljamo tudi pri raziskovalnem delu na Inštitutu za mikrobiologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Raziskovalno delo poteka zaenkrat na pe-

\*Asist. Mag. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 61105 Ljubljana

\*\*Doc. dr. sc. Tatjana Avšič-Županc, dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 61105 Ljubljana

\*\*\*Asist. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 61105 Ljubljana

tih virusnih modelih: hantavirusih, humanih virusih papiloma, virusu hepatitisa C, virusu klopnega meningoencefalitisa in humanem virusu imunske pomanjkljivosti (5–24).

V prispevku bomo predstavili teoretične osnove te nove, visoko občutljive in specifične virološke metode in osnovne načine njene optimizacije. Opisali bomo najbolj pogoste probleme in težave, ki se pojavljajo pri rutinski uporabi PCR, ter nekatere ukrepe za njihovo odpravo oz. zmanjšanje. Na kratko bomo prikazali tudi današnje možnosti uporabe PCR v raziskovanju in diagnostiki virusnih okužb.

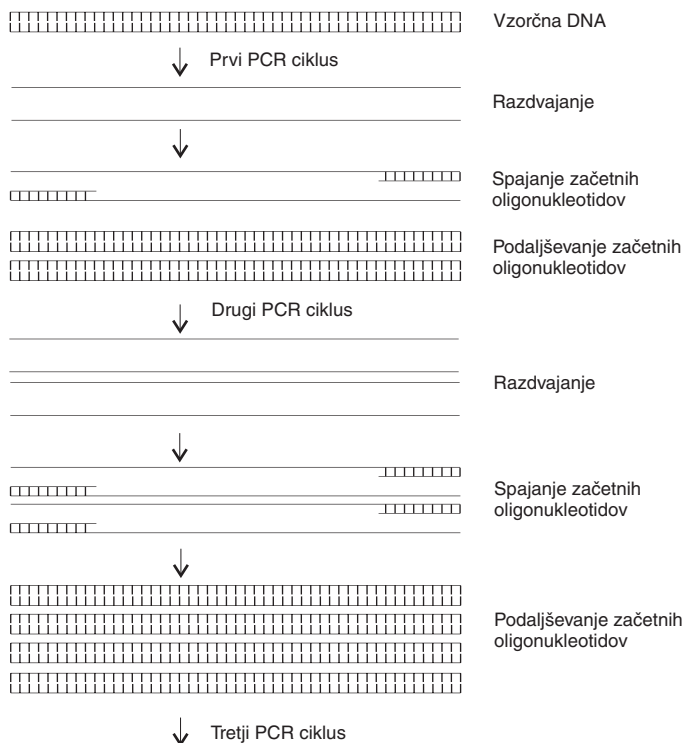
## Teoretične osnove PCR

Dokazovanje virusov s PCR temelji na in vitro pomnoževanju za določen virus specifičnega, majhnega odseka njegovega dednega materiala. Temu sledi dokazovanje specifičnosti pomnoženega virusnega genomskega odseka (25, 26).

Glavni predpogoj za uspešno pomnoževanje s klasično različico metode PCR je predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela virusnega genoma (25). To nam omogoča pravilno izbiro dveh kratkih značilnih odsekov nukleinskih kislin, t.i. oligonukleotidnih začetnikov ali začetnih oligonukleotidov (angl. primers), komplementarnih z mejnima deloma specifičnega odseka virusnega genoma, ki ga želimo pomnožiti (t.i. tarčni odsek virusnega genoma). Začetna oligonukleotida se spajata z nasproti ležečima vijačnicama tarčnega odseka virusne DNA in sta usmerjena tako, da sinteza nove DNA poteka v prostoru med njima. Zato je velikost novo nastalih delcev DNA odvisna od njune medsebojne razdalje. S klasično metodo PCR je mogoče v nekaj urah dobiti več kot milijon kopij tega specifičnega odseka virusnega genoma (4, 25).

PCR se v svoji klasični različici izvaja na naslednji način. Iz kliničnega materiala najprej z ustrežno metodo izoliramo celotno DNA. Tej dodamo vse štiri osnovne gradbene sestavine nukleinskih kislin – deoksinukleotidtrifosfate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), par začetnih oligonukleotidov, temperaturno obstojni encim DNA-polimerazo ter posebno prirejeno pufer, ki omogoča potek encimske reakcije (pufer vsebuje predhodno določene optimalne koncentracije Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl in detergenta Tween 20). Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar pomeni en temperaturni cikel PCR. Izbira inkubacijskih temperatur ter hiter prenos vzorca iz določenega temperaturnega območja v drugo sta zelo pomembna. Pri prvi temperaturi (navadno 95°C) dvovijačna molekula vzorca preide v dve enovijačni molekuli DNA. Ta proces imenujemo razdvajanje (angl. denaturation). Druga temperatura (ustrezno izbrana med 45 in 75°C) pogojuje spajanje začetnih oligonukleotidov (angl. primer annealing) s komplementarnima deloma vzorčne DNA (mejna dela tarčnega odseka DNA). Podaljševanje začetnih oligonukleotidov (angl. primer extension) oz. sinteza nove komplementarne molekule DNA v smeri od 5' konca proti 3' koncu s pomočjo encima temperaturno obstojne DNA-polimeraze se odvija med tretjo inkubacijo (najbolj pogosto pri temperaturi 72°C). Novi molekuli DNA, ki nastaneta s podaljševanjem začetnih oligonukleotidov, sta med seboj komplementarni in sposobni v novem temperaturnem ciklusu s tremi inkubacijami vezati enake začetne oligonukleotide. Vsak naslednji temperaturni cikel podvojuje količino tarčnega odseka DNA. Ker je PCR sestavljen iz 25- do 40-kratnega zapored-

nega ponavljanja določenega temperaturnega ciklusa, je končni rezultat dogajanja eksponentno kopičenje značilnih tarčnih odsekov virusne DNA ali t.i. PCR-pridelkov. Po zadnjem ciklusu se celotna encimska reakcija največkrat ustavi z ohladitvijo reakcijske mešanice na +4°C. Shema poteka verižne reakcije s polimerazo je prikazana na sliki 1.



Slika 1. Shematski prikaz poteka verižne reakcije s polimerazo.

Čeprav je mogoče PCR izvesti tudi z ročnim prestavljanjem vzorcev iz enega temperaturnega območja v drugo, je šele razvoj modernih, računalniško vodenih inkubacijskih aparatov omogočil širšo uporabo te metode (25).

## Optimizacija PCR

Zaradi vpliva številnih znanih in neznanih dejavnikov na kompleksni encimski »ustroj« za pomnoževanje je treba za učinkovit in zadovoljiv potek PCR vse dejavnike reakcije optimizirati (4, 25–28).

### Začetni oligonukleotidi

Ker začetni oligonukleotidi izbirajo odsek virusnega genoma, ki bo v reakciji pomnožen, je pravilen izbor le-teh najbolj pomemben korak optimizacije PCR. Večina raziskovalcev se danes strinja, da je treba pri izbiranju začetnih oligonukleotidov upoštevati določena pravila (26, 29). Začetni oligonukleotidi naj ne bi bili krajši ali daljši od 14 oz. 30 nukleotidov, skupna količina nukleinskih baz G in C naj bi predstavljala 50–60 % začetnega oligonukleotida, razporeditev vseh baz pa naj bi bila naključna (izogibati se je treba večkratnemu zaporednemu ponavljanju istih baz). Priporočajo, da 3' konec začetnega oligonukleotida ne bi bil sestavljen iz treh ali več nukleinskih baz T, ker bi takšno zaporedje lahko privedlo do napačnega spajanja s poliA koncem informacijskih RNA (mRNA). Izogibati se je treba tudi medsebojne komplementarnosti zaporedja na 3' koncu para začetnih oligonukleotidov, ker bi ta, namesto spajanja s komplementarnima tarčnima odsekoma vzorčne DNA privedla do njunega medsebojnega spajanja. Oba začetna oligonukleotida naj bi imela takšno sestavo, da je njuna t.i. temperatura tališča ( $T_m$ , iz angl. melting temperature) približno enaka. Temperaturo tališča (v °C) v praksi največkrat računamo po formuli  $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 3$ , kjer G, C, A, T pomenijo število določenih nukleinskih baz v začetnem oligonukleotidu (29).

Viruse, ki imajo več tipov ali podtipov (npr. humani virusi papiloma, adenovirusi), lahko dokazujemo z uporabo dveh različnih vrst začetnih oligonukleotidov (10). Če želimo v eni sami reakciji PCR zajeti več tipov določenega virusa, uporabimo za pomnoževanje t.i. grupno specifične začetne oligonukleotide, izbrane tako, da so skladni s področji genoma, ki so enaki pri večini tipov določenega virusa. Dobljeni pomnoženi del virusnega genoma potem analiziramo z dodatnimi metodami (glej dalje) in tako določimo tip virusa. Lahko pa se odločimo za začetne oligonukleotide, specifične samo za posamezen tip ali podtip virusa (t.i. tip-specifični začetni oligonukleotidi), ki jih izberemo tako, da so skladni s področji genoma, specifičnimi samo za izbrani tip virusa. Dobljeni pomnoženi del virusnega genoma je zato značilen za določeni tip virusa in ga ni treba dodatno analizirati.

Pravilnost izbranega zaporedja začetnih oligonukleotidov lahko danes preverjamo s posebnimi računalniškimi programi. Če kljub upoštevanju vseh naštetih pravil ne pride do zadovoljivega rezultata reakcije PCR, je treba izbrane začetne oligonukleotide zamenjati.

Koncentracije začetnih oligonukleotidov, ki se najpogosteje uporabljajo v reakciji PCR, znašajo od 0,1 do 0,5 mM. Pri uporabi večjih koncentracij začetnih oligonukleotidov lahko pride do kopičenja nespecifičnih PCR-pridelkov. Najbolj pogosti nespecifični pridelki so t.i. od ciljne DNA neodvisni PCR-pridelki (angl. primer-dimer), ki največkrat nastajajo kot posledica medsebojne komplementarnosti para začetnih oligonukleotidov. Nespecifični pridelki, nastali v zgodnjih ciklih, tekmujejo s tarčnim odsekom vzorčne DNA za encim DNA-polimerazo, deoksinukleotidtrifosfate in začetne oligonukleotide in na ta način lahko bistveno zmanjšajo učinkovitost specifičnega pomnoževanja.

## Razdvajanje

Pogost vzrok neuspešne reakcije PCR je nepopolno razdvajanje tarčne dvovijačnice. Pri običajni temperaturi razdvajanja (95°C) ta proces navadno traja le nekaj sekund. Kar dar je ciljna DNA bogata z nukleinskima bazama G in C, je treba za razdvajanje uporabiti nekoliko višjo temperaturo ali podaljšati čas razdvajanja, vendar moramo paziti, da ti ukrepi ne privedejo do nepotrebne izgube encimske aktivnosti temperaturno obstojne DNA-polimeraze.

## Spajanje začetnih oligonukleotidov

Izbor optimalne temperature spajanja začetnih oligonukleotidov ter njen natančen nadzor, zlasti v začetnih temperaturnih ciklikih, je najzahtevnejši del optimizacije same reakcije PCR. Od izbire te temperature je namreč odvisna stopnja specifičnosti reakcije (25, 29, 30). Pri delu z višjimi temperaturami spajanja se zmanjšuje možnost napačnega spajanja začetnih oligonukleotidov s tarčno DNA in možnost posledičnega nastanka nespecifičnih PCR-pridelkov. Pri tem je treba paziti, da izbrana visoka temperatura spajanja ne privede do zmanjševanja učinkovitosti pomnoževanja. Primer uspešne optimizacije reakcije PCR s spreminjanjem temperature spajanja začetnih oligonukleotidov je prikazan na sliki 2.

*Slika 2. Primer uspešne optimizacije reakcije PCR s spreminjanjem temperature spajanja začetnih oligonukleotidov. Iz slike je razvidno, da smo z zvišanjem temperature spajanja (od 50°C do 65°C) pomembno vplivali na specifičnost reakcije PCR (zmanjševanje števila nespecifičnih PCR-pridelkov), previsoka temperatura spajanja (68°C in več) pa je preprečila proces pomnoževanja. Optimalna temperatura spajanja za predstavljeni sistem je približno 65°C. Elektroforna kolona A: molekularni označevalec 123 (Gibco BRL, Bethesda, ZDA); elektroforna kolona B: molekularni označevalec št. VI (Boehringer Mannheim, Nemčija).*

### Podaljševanje začetnih oligonukleotidov

Trajanje procesa podaljševanja začetnih oligonukleotidov je odvisno od dolžine tarčnega odseka DNA, koncentracije vzorčne DNA in temperature. Pri standardni temperaturi podaljševanja, ki znaša 72°C, se začetni oligonukleotid v eni sekundi podaljša za približno 50 do 100 nukleotidov. Če je koncentracija tarčne DNA zelo nizka, je treba čas podaljševanja začetnih oligonukleotidov podaljšati v prvih nekaj temperaturnih ciklih, zlasti pa v zaključnih ciklih, ko je encimska aktivnost DNA-polimeraze že bistveno zmanjšana.

### Število temperaturnih ciklov

Optimalno število temperaturnih ciklov je odvisno predvsem od začetne koncentracije vzorčne DNA. S prevelikim številom ciklov se povečuje možnost nastanka nespecifičnih PCR-pridelkov, majhno število ciklov pa nasprotno lahko privede do nastanka premajhne količine PCR-pridelkov. V optimizirani reakciji PCR je navadno od 25 do 35 temperaturnih ciklov.

### Deoksinukleotidtrifosfati

Pomembno je, da delovna mešanica vsebuje enake količine vsakega posameznega deoksinukleotidtrifosfata (dNTP). V standardizirani reakciji se navadno uporabi po 200 mM vsakega dNTP.

### Temperaturno obstojna DNA-polimeraza

V začetnem obdobju so PCR izvajali s pomočjo Klenowega odseka encima DNA-polimeraze *Escherichiae coli* (1). Ker ta encim ni bil odporen na visoke temperature, ga je bilo treba dodajati po vsakem ciklusu PCR, kar je bistveno otežilo izvedbo metode. Odkritje temperaturno obstojnih DNA-polimeraz, ki prenesajo ponavljajoče izpostavljanje visoki temperaturi (do 45 minut pri 95°C), je znatno olajšalo postopek reakcije (27, 31). Med temi encimi se danes najpogosteje uporablja Taq DNA-polimeraza, osamljena iz seva YT1 bakterije *Thermus aquaticus*, ki naseljuje izvire vroče vode narodnega parka Yellowstone v ZDA. Optimalna količina Taq DNA-polimeraze znaša 2,5 U na 100 µl reakcijske mešanice, pod pogojem da so vsi ostali reakcijski dejavniki uravnoteženi. Manjše koncentracije navadno zmanjšajo količino želenega PCR pridelka, večje pa privedejo do nastajanja nespecifičnih pridelkov pomnoževanja.

### Koncentracija magnezija

Natančnost reakcije, ki jo katalizira Taq DNA-polimeraza, je v veliki meri odvisna od koncentracije magnezijevih ionov v reakcijski mešanici. Koncentracije, ki se najpogosteje uporabljajo, znašajo od 1,2 do 2,5 mM. Previsoka koncentracija magnezijevih ionov lahko privede do nastanka nespecifičnih PCR-pridelkov, medtem ko lahko prenizka koncentracija zmanjša učinkovitost pomnoževanja. Glede na to, da dNTP vežejo magnezijeve ione, predstavlja dejansko koncentracijo ionov, ki jih potrebuje Taq polimeraza (t.i. prosti magnezij), razlika med koncentracijo dodanega magnezijevega klorida in koncen-

tracijo dodanih dNTP. Primer uspešne optimizacije reakcije PCR z uporabo različnih koncentracij prostega magnezija je prikazan na sliki 3.

*Slika 3. Primer uspešne optimizacije reakcije PCR z uporabo različnih koncentracij prostega magnezija v reakcijski mešanici. Iz slike je razvidno, da je optimalna koncentracija prostega magnezija za predstavljeni sistem 0,4 mM. Pri koncentraciji 0,0 mM prostega magnezija ni prišlo do pomnoževanja, pri koncentraciji 0,2 mM je bila učinkovitost pomnoževanja bistveno zmanjšana, medtem ko je pri koncentracijah, višjih od 0,7 mM, prišlo do pojava nespecifičnega pomnoževanja. Elektroforezna kolona m: molekularni označevalec št. V (Boehringer Mannheim, Nemčija).*

### **Metode za dokazovanje PCR-pridelkov**

Po končani reakciji PCR je treba rezultat pomnoževanja opredeliti kot pozitiven ali negativen, na kar sklepamo iz dokaza prisotnosti oz. odsotnosti pomnoženega tarčnega odseka virusnega dednega materiala (PCR-pridelek) v reakcijski mešanici in iz potrditve njegove specifičnosti (2, 29, 30).

Zaradi hitrosti, enostavnosti in nizke cene v ta namen največkrat uporabljamo metodo ločevanja delcev DNA po velikosti s pomočjo elektroforeze v gelu. S to metodo lahko določimo približno velikost neznanega delca DNA tako, da primerjamo njegovo velikost z velikostjo standardnih delcev DNA, ločenih pod istimi pogoji elektroforeze. Če se v toku elektroforeze pokaže en sam PCR-pridelek (delec DNA), ki je po velikosti približno enak teoretično določeni velikosti tarčnega odseka virusnega genoma, potem lahko z določeno stopnjo verjetnosti sklepamo, da je rezultat reakcije PCR pozitiven oz. da je virus prisoten v testnem vzorcu (slika 4, elektroforezni koloni A in B). Kadar pa se v toku elektroforeze pojavi več PCR-pridelkov (tudi če je eden izmed njih pričakovane velikosti), o rezultatu reakcije PCR ne moremo sklepati samo na osnovi rezultatov elektroforeze (slika 4, elektroforezni koloni E in F).

Slika 4. Primeri pozitivnih (elektroforezni koloni A in B), negativnih (elektroforezni koloni C in D) in nejasnih rezultatov (elektroforezni koloni E in F) pomnoževanja 365 bp dolgega dela M genomskega odseka različnih hantavirusov. Elektroforezni koloni M: molekularni označevalci 123 (Gibco BRL, Bethesda, ZDA).

Dokaz PCR-pridelka z elektroforezo v gelu je razmeroma zanesljiv. Zaradi nizke specifičnosti elektroforeze v gelu je danes treba, zlasti če PCR uporabljamo za dokazovanje virusov v diagnostične namene, specifičnost dokazanega PCR pridelka dodatno potrditi z uporabo bolj specifičnih metod (2, 28–30).

Najbolj enostavna in hitra metoda za dodatni dokaz specifičnosti PCR-pridelkov je njihova encimska razgradnja. Metodo izvajamo največkrat tako, da PCR-pridelek za določen čas izpostavimo delovanju ustrezne restrikcijske endonukleaze (encimi, ki režejo dvojnovojačno DNA na točno določenem mestu). Specifičnost PCR-pridelka potrdimo, če ga restrikcijski encim razgradi na delce, ki tako po velikosti kot po številu ustrezajo predhodno teoretično določenemu vzorcu razgradnje. Zanesljivost metode narašča s povečevanjem števila uporabljenih restrikcijskih endonukleaz. Z ustrezno izbranimi restrikcijskimi endonukleazami je metodo mogoče uporabiti tudi za razlikovanje posameznih tipov ali podtipov določenega virusa oz. tipizacijo virusov (slika 5) (5, 6, 10, 12–14, 16).

Veliko bolj natančna je skupina hibridizacijskih metod, med katerimi je najbolj zanesljiva metoda hibridizacije po Southernu. Pri tej metodi po ločevanju z elektroforezo v gelu PCR-pridelke prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko membrano z uporabo klasičnega (Southernovega) ali vakuumskega načina prenosa. Nato na membrani izvedemo hibridizacijo z uporabo kratkega značilnega delca DNA t.i. DNA-sonde, ki je skladna (komplementarna) z določenim delom PCR-pridelka in največkrat radioaktivno označena. Dodana DNA-sonda bo hibridizirala s PCR-pridelkom na membrani, samo če v njem najde skladno zaporedje nukleotidov. Po hibridizaciji odstranimo prebitek DNA-sonde, položaj PCR-pridelkov, ki so hibridizirali s sondo, pa ugotovimo s filmom, občutljivim za sevanje. Kljub zelo visoki specifičnosti in občutljivosti se ta metoda zaradi nekaterih pomanjkljivosti v rutinski diagnostiki zaenkrat malo uporablja. Ni namreč primer-



Slika 5. Primer razlikovanja hantavirusov Puumala (PUU) in Hantaan (HTN) na osnovi različnih obrazcev encimske razgradnje 365 bp dolgega pomnoženega dela M genomskega odseka. Elektroforezna ločitev razgrajenega PCR-pridelka virusa Puumala (PUU) z restriktivnimi encimi: *Rsa I* (241, 124 bp), *Hinf I* (252, 113 bp), *Acc I* (365 bp), *Alu I* (243, 122 bp) in *Sty I* (304, 61 bp) ter PCR pridelka virusa Hantaan (HTN) z restriktivnimi encimi: *Rsa I* (288, 77 bp), *Hinf I* (365 bp), *Acc I* (241, 124 bp), *Alu I* (263, 93bp) in *Sty I* (250, 61, 54 bp). Elektroforezna kolona M: molekularni označevalec št. VI (Boehringer Mannheim, Nemčija).

na za obdelavo večjega števila vzorcev, je zamudna, draga in relativno nevarna, če uporabljamo radioaktivne označevalce. Pogostejšo uporabo te visoko specifične metode, tudi v diagnostične namene, bo verjetno omogočila nedavna uvedba neradioaktivnih označevalcev (digoksinin, biotin) (4, 25, 28).

Mnogo bolj uporabna različica predhodno opisane metode je metoda dot-blot, pri kateri se PCR-pridelek neposredno (brez predhodne ločitve z elektroforezo) s pomočjo vakuuma nanaša na najlonsko membrano (4, 13, 25, 32). Temu sledi hibridizacija z uporabo radioaktivno ali neradioaktivno označenih sond po predhodno opisanem postopku. V primeru pozitivnega rezultata hibridizacije je na filmu (radioaktivna različica) ali na najlonski membrani (neradioaktivna različica) viden madež. Prav zaradi oblike pozitivnega rezultata so navedeno metodo imenovali dot-blot (iz angl. dot = madež) (slika 6). Metoda je cenejša, hitrejša in primernejša za analizo večjega števila vzorcev; njene negativne strani pa so manjša specifičnost v primerjavi s hibridizacijo po Southernu in možnost lažno pozitivnih rezultatov, če hibridizacije ne izvajamo v strogo nadzorovanih pogojih.

Različico metode dot-blot, v kateri je namesto PCR-pridelka na najlonski membrani nanesena neoznačena DNA-sonda, imenujemo reverzni dot-blot. Hibridizacijo v tem primeru izvajamo s PCR-pridelkom, ki je nastal z uporabo največkrat neradioaktivno označenih začetnih oligonukleotidov (2, 4).

V zadnjem času se za potrditev specifičnosti PCR-pridelkov vse več uporablja sistem, ki temelji na uporabi encimsko oligonukleotidnega testa (ELOSA, angl. enzyme linked oligonukleotide sorbent assay) (33, 34). Kot pri reverznem dot-blotu PCR izvajamo z uporabo neradioaktivno (npr. z biotinom) označenih začetnih oligonukleotidov. Po končanem PCR ne naredimo elektroforeze, ampak PCR-pridelek prenesemo v vdolbinico mikrotitrske ploščice, katere notranjost je prekrita z neoznačeno DNA-sondo in v kateri

Slika 6. Primer dokazovanja specifičnosti PCR-pridelka in istočasne tipizacije humanih virusov papiloma (HPV) z dot-blot hibridizacijo. Hibridizacije so izvedene z uporabo HPV-grupno specifične sonde (kolona G) ter za HPV-tipe 6, 11, 16, in 18 tip-specifičnih sond (kolone 6, 11, 16, 18). Kolona O: negativna kontrola hibridizacije. Vrsta K, pozitivne kontrole hibridizacije. Vrsta ESCP: PCR-pridelek iz tkivnega vzorca ploščatoceličnega papiloma požiralnika. Iz slike je razvidno, da smo z dot-blot hibridizacijo dokazali prisotnost HPV tipa 6 v tkivnem vzorcu ploščatoceličnega papiloma požiralnika.

poteka hibridizacija. V primeru uspešne hibridizacije vezani biotin prikažemo z uporabo visokospecifičnega avidina ali antibiotinskih protiteles, ki so označena z encimom, alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo. Po dodatku substrata se pri pozitivni reakciji vsebina vdolbinice obarva (slika 7). Ker je intenziteta barve, ki jo merimo spektrofotometrično, sorazmerna količini PCR-pridelka (in s tem tudi količini virusa, ki ga določamo), lahko metodo uporabimo tudi v kvantitativne namene.

Zelo pogosto se v zadnjem času za dokazovanje specifičnosti PCR-pridelkov uporablja tudi različica reakcije PCR, t.i. PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (angl. nested PCR) (14, 35–38). V tej reakciji se po končanem klasičnem postopku PCR ponovno pomnožuje PCR-pridelek, vendar z uporabo para začetnih oligonukleotidov, ki se pripenjata v prostor med prvotno uporabljenima začetnima oligonukleotidoma (slika 8).

Vse naštetje metode le posredno dokažejo specifičnost PCR-pridelka (seveda z različnimi stopnjami verjetnosti). Edina metoda, s katero dokončno in popolnoma potrdimo specifičnost PCR-pridelka, je določevanje njegovega nukleotidnega zaporedja oz. sekvenčna analiza (7, 25, 29). Ker je metoda časovno zamudna, draga in tehnično zahtevna, se danes le izjemoma uporablja v rutinske namene. Upamo, da bo hitri razvoj avtomatiziranih tehnik sekvenčne analize in pogostejša uporaba neradioaktivnih označevalcev že v bližnji prihodnosti odprl možnost širše rutinske uporabe te visoko specifične metode.

Slika 7. Prikaz pomnoževanja 244 bp dolgega specifičnega dela genoma virusa hepatitisa C z elektroforezo v gelu (zgoraj) in primer dokazovanja specifičnosti PCR-pridelka z encimsko oligonukleotidnim testom (spodaj). Vrste 2, 4 in 6: primeri uspešnega pomnoževanja (zgoraj) in dokaz specifičnosti pomnoženega odseka virusnega genoma (spodaj). Vrste 1, 3, 5, in 7: primeri neuspešnega pomnoževanja specifičnega odseka virusnega genoma. Vrsta M: molekularni označevalec 123 (Gibco BRL, Bethesda, ZDA).

Slika 8. Primer dokazovanja specifičnosti 365 bp dolgega pomnoženega dela M genomskega odseka treh izolatov hantavirusa Dobrava (elektroforezne kolone A) s PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi. V reakciji so pomnoženi 187 bp dolgi odseki PCR-pridelkov predhodne reakcije z uporabo začetnih oligonukleotidov, ki se pripenjata v prostor med prvotno uporabljenima začetnima oligonukleotidoma (elektroforezne kolone B). Elektroforezna kolona M, molekularni označevalec 123 (Gibco BRL, Bethesda, ZDA).

## Postopki za zmanjševanje možnosti lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov reakcije PCR

Glavna pomanjkljivost, ki zaenkrat ovira večjo uporabo PCR v diagnostični virologiji, je razmeroma pogost pojav lažno pozitivnih rezultatov (lažen dokaz virusa, ki v kliničnem vzorcu ni prisoten) in lažno negativnih rezultatov (neuspešen dokaz virusa, ki je sicer prisoten v kliničnem vzorcu) (2, 28–30, 39, 40).

Lažno pozitivni rezultati so neposredna posledica izredno visoke občutljivosti reakcije (30). Čeprav lahko nastanejo zaradi kontaminacije testnega vzorca z drugim testnim vzorcem (angl. sample to sample contamination), je njihov najpogostejši vzrok kontaminacija s PCR-pridelki predhodnih reakcij PCR, izvedenih v določenem laboratoriju (angl. PCR carryover ali amplicon carryover) (30, 40). V laboratorijih, v katerih se izvaja veliko število preiskav (kot so diagnostični laboratoriji), namreč sčasoma količina PCR-priredkov naraste do te mere, da se le-ti začnejo pojavljati povsod (na površini laboratorijske opreme, v kemikalijah, na telesu in obleki laboratorijskih delavcev). Zaradi tega pojava se po kratkem začetnem obdobju brez tovrstnih težav začnejo v laboratoriju pojavljati lažno pozitivni rezultati, katerih število postopoma narašča do te mere, da je onemogočena nadaljnja diagnostika (30). Večina avtorjev danes meni, da na svetu ni molekularno diagnostičnega laboratorija, ki ne bi imel težav s kontaminacijami (2, 29, 40). Zato prevladuje mnenje, da se lažno pozitivnim rezultatom reakcije PCR zaenkrat ni mogoče popolnoma izogniti, ampak se s posebnimi ukrepi lahko samo zmanjša možnost njihovega nastanka na najmanjšo možno mero (29, 30, 39, 40). Ti ukrepi so lahko nespecifični in specifični.

Nespecifični ukrepi obsegajo upoštevanje naslednjih pravil pri delu (30, 40):

- Obvezna je uporaba in pogosta menjava rokavic.
- Prostore, v katerih izvajamo molekularno diagnostiko, je treba fizično ločiti na najmanj tri dele (t.i. pred PCR-, PCR-, po PCR-prostori), ki morajo biti opremljeni tako, da ima vsak svojo lastno laboratorijsko opremo, zlasti komplet pipet ter ustrezne nastavke. Vzorci se lahko prenašajo samo v smeri od pred PCR-prostora v po PCR-prostor. V pred PCR-prostoru mora biti obvezno komplet pipet s pozitivnim potiskom (angl. positive displacement) ali pa komplet pipet z nastavki z aerosolno bariero.
- Pred odpiranjem posodic s PCR-reagenti je treba vsebino vsakokrat na kratko centrifugirati (angl. spin down).
- Skupne reagente za več vzorcev se pripravlja v obliki skupne reakcijske mešanice (angl. master mix).
- Vzorčna DNA se v reakcijsko mešanico vedno dodaja zadnja. Za dodatno zmanjševanje možnosti nespecifičnega pomnoževanja v zadnjem času priporočajo dodajanje DNA šele, ko je reakcijska mešanica že segreta nad 80°C (angl. hot start PCR).
- Izogibati se je treba uporabi močno koncentriranih pozitivnih kontrol.
- V vsako reakcijo PCR je treba vključiti najmanj dve negativni kontroli. Kot negativno kontrolo se največkrat uporablja celotna reakcijska mešanica, v kateri je sicer prisotna DNA, vendar brez ustreznega tarčnega zaporedja.
- Vse delovne površine ter laboratorijski pribor je treba po končani reakciji temeljito očistiti ter izpostaviti delovanju UV-svetlobe.

V laboratorijih z večjim številom PCR-analiz se poleg naštetih nespecifičnih postopkov za zmanjševanje možnosti lažno pozitivnih rezultatov uporabljata tudi dva specifična postopka: encimski in kemični (39–42).

Pri encimskem postopku v reakcijski mešanici dTTP zamenjamo z dUTP, kar privede do nastanka PCR-pridelkov, ki vsebujejo za DNA nenaravno nukleotidno bazo uracil. Na ta način lahko razlikujemo PCR-pridelke tarčnega dela DNA, ki vsebujejo uracil in predstavljajo možne vire kontaminacije, od izhodnega tarčnega dela vzorčne DNA (vsebuje timin). Če pred reakcijo PCR dodamo N-uracil glikozilazo (razgrajuje nukleinske kisline, ki vsebujejo nukleotidno bazo uracil), bo ta v primeru PCR-prenosa (angl. PCR carry-over) uničila PCR-pridelke predhodnih reakcij (ker ti vsebujejo uracil), ne pa tarčne DNA in na ta način preprečila kontaminacijo (41).

Kemični postopek vključuje uporabo izopsoralena, ki ga dodajamo v reakcijsko mešanico pred izvajanjem PCR. Po končanem pomnoževanju reakcijsko mešanico za kratek čas izpostavimo delovanju UV-svetlobe, ki aktivira izopsoralen in povzroči njegovo vezavo na PCR-pridelek. Na ta način je PCR-pridelek kemično tako spremenjen, da je onemogočeno vsako njegovo nadaljnje pomnoževanje in s tem možnost kontaminacije (42).

*Slika 9. Primer pravilne razlage rezultatov reakcije PCR. Rezultati pomnoževanja 450 bp dolgega dela genomskega odseka L1 humanih virusov papiloma (HPV) (elektroforezne kolone, označene s črko B) ter 268 bp dolgega dela humanega gena za betaglobin (notranje kontrolno pomnoževanje) (elektroforezne kolone, označene s črko A). Elektroforezna kolona M, molekularni označevalec 123 (Gibco BRL, Bethesda, ZDA). Iz slike je razvidno, da je v tkivnem vzorcu št. 1 prisoten HPV, v tkivnem vzorcu št. 2 ga ni, medtem ko prisotnosti HPV v tkivnem vzorcu št. 3 zaradi negativnega pomnoževanja notranje kontrole ne moremo opredeliti.*

Lažno negativni rezultati reakcij PCR so naslednji problem, s katerim se pogosto srečujejo molekularno virološki laboratoriji. Največkrat omenjeni vzroki lažno negativnih rezultatov so: nekvalitetna izolacija DNA, prisotnost inhibitornih snovi v reakcijski mešanici ter nepravilna izbira začetnih oligonukleotidov in pogojev pomnoževanja (2, 26, 29).

Najbolj učinkovit postopek za zmanjševanje možnosti lažno negativnih rezultatov je kvalitetna izolacija DNA iz kliničnega vzorca. Danes poznamo številne učinkovite postopke izolacije DNA iz različnih kužnin (krvi, seča, blata, likvorja), svežih, zmrznjenih in fiksiranih tkivnih vzorcev, citoloških razmazov ter tudi iz arhivskih materialov, starih več tisoč let (4, 43). Kljub uporabi učinkovitih postopkov izolacije DNA je treba zaradi vpliva številnih znanih in neznanih dejavnikov, ki lahko privedejo do inhibicije delovanja kompleksnega encimskega »ustroja« za pomnoževanje, vedno izvesti tudi t.i. notranje kontrolno pomnoževanje. Notranje kontrolno pomnoževanje je pomnoževanje delov ubikvitarnih humanih genov (betaglobin, betaaktin, deli HLA-genov) hkrati s tarčnim delom vzorčne DNA (slika 9). Uspešno pomnoževanje notranje kontrole pomeni, da v vzorcu ni inhibitorjev PCR-reakcije. V primeru negativnega pomnoževanja notranje kontrole pa dobljenega rezultata reakcije PCR ne moremo opredeliti. Zaenkrat so zanesljive notranje kontrole znane le za pomnoževanje DNA, medtem ko so za pomnoževanje RNA tovrstne kontrole šele v razvoju (2, 26, 29).

*Slika 10. Primer uporabe dveh parov začetnih oligonukleotidov, specifičnih za različna genomska področja istega virusa, kot ukrepa za zmanjšanje možnosti lažno negativnih rezultatov reakcije PCR. Uspešni dokaz prisotnosti humanega virusa imunske pomankljivosti (HIV) v krvi slovenskega bolnika z uporabo za HIV specifičnih začetnih oligonukleotidov SK 38/39 (115 bp, kolona A) in SK 145/431 (142 bp, kolona B). Kolona C: notranje kontrolno pomnoževanje 268 bp dolgega dela humanega gena za betaglobin; kolona M: molekularni označevalec št. V (Boehringer Mannheim, Nemčija).*

Možnost pojavljanja lažno negativnih rezultatov reakcije PCR lahko zmanjšamo tudi z uporabo več parov začetnih oligonukleotidov (specifičnih za različna genomska področja istega virusa) namesto enega samega para ali z uporabo začetnih oligonukleotidov, ki vsebujejo nukleotidno bazo inozin (ki se lahko pari z vsemi nukleotidnimi bazami), oz. degenerativnih začetnih oligonukleotidov. Ta ukrep je skoraj nepogrešljiv v primeru odkrivanja okužbe z virusi z zelo variabilnim genomom (npr. retrovirusi) (slika 10). Dodatni ukrepi, ki jih priporočajo za zmanjševanje lažno negativnih rezultatov reakcije PCR, so še: uporaba visoko občutljivih metod za dokazovanje PCR-pridelkov, uporaba visoko kvalitetnih, predhodno testiranih kemikalij, zlasti kvalitetne, temperaturno obstojne DNA-polimeraze, uporaba modernih računalniško vodenih inkubacijskih aparatov ter izmenjava izbranih testnih vzorcev z referenčnimi ali tehnično dobro usposobljenimi laboratoriji po svetu (2, 4, 26, 28, 30).

### Dokazovanje RNA-virusov

Dokazovanje RNA-virusov s PCR je zaradi ubikvitarne prisotnosti encimov RNaz, ki hitro in učinkovito razgrajujejo RNA, veliko bolj zahtevno kot dokazovanje DNA-virusov. Zaradi izredne občutljivost molekule RNA mora celotni postopek (od izolacije RNA do PCR) potekati v posebnih pogojih, v katerih je možnost navzočnosti teh encimov zmanjšana do najmanjše možne mere (angl. RNase-free conditions). Te praktično ustvarjamo z delom v strogih aseptičnih pogojih in z dodatno kemično inaktivacijo RNaz, največkrat z dietil pirokarbonatom (DEPC) (4, 29, 44).

Za razliko od DNA lahko z do danes razvitimi metodami dovolj kvalitetno RNA izoliramo le iz svežih ali primerno zmrznjenih kliničnih materialov, ne pa iz fiksiranih vzorcev in arhivskih materialov. V ta namen so doslej največkrat uporabljali gvanidin-izotiocianat-cezijkloridno (45) ter gvanidin-izotiocianat-fenol-kloroformsko metodo (46).

Ker s PCR lahko pomnožujemo le molekule DNA, je treba pred izvajanjem PCR izolirano virusno RNA prepisati v komplementarno virusno DNA (cDNA, angl. complementary DNA). Za prepisovanje se najpogosteje uporabljajo naslednji encimi (4, 47):

- reverzna transkriptaza, osamljena iz virusa ptičje mieloblastoze (AMV, angl. Avian Myeloblastosis Virus);
- reverzna transkriptaza, osamljena iz virusa mišje mieloične levkemije (MMLV, angl. Moloney Murine Leukemia Virus);
- rekombinantna temperaturno obstojna DNA-polimeraza, osamljena iz bakterije *Thermus thermophilus* (rTth, angl. thermostable recombinant *Thermus thermophilus* DNA polymerase).

Sintezo virusne cDNA največkrat dosežemo z uporabo treh različnih vrst začetnih oligonukleotidov (4, 47):

- z nespecifičnimi t.i. »naključnimi« začetnimi oligonukleotidi (angl. random hexamer), ki predstavljajo zmes vseh mogočih kombinacij oligonukleotidov dolžine 6 baz (s temi začetnimi oligonukleotidi prepisemo celotno RNA, prisotno v vzorcu, vključno z virusno);
- z enim, za virus specifičnim začetnim oligonukleotidom (angl. downstream primer), s katerim prepisemo samo RNA določenega virusa;

- z začetnimi oligonukleotidi, sestavljenimi iz 16 do 20 nukleinskih baz T, t.i. oligo dT nukleotidi (ti začetni oligonukleotidi se uporabljajo samo za prepisovanje informacijske RNA, ker prepoznajo poliA konec teh molekul).

Po končanem prepisovanju virusne RNA v cDNA z uporabo temperaturno obstojne DNA-polimeraze ter para za virus specifičnih začetnih oligonukleotidov, izvedemo predhodno opisani klasični postopek pomnoževanja.

## Uporabnost PCR v virologiji

Kmalu po odkritju PCR so nekateri raziskovalci napovedali veliko uporabnost te metode v virologiji (27). Že zgodnje raziskave so potrdile pričakovanja, vendar je revolucionarnost PCR presenetila tudi največje optimiste, saj v zgodovini virologije še ni bilo metode, ki bi v tako kratkem času tako močno spremenila potek in način raziskovanja virusnih okužb (2, 26, 27). Eksplozija raziskav je omogočila, da smo se v borih nekaj letih naučili na povsem nov način raziskovati skoraj vse medicinsko pomembne viruse. Pregled, po mnenju avtorjev, ključnih PCR-raziskav na področju virologije je podan v tabeli 1. Hitro vključevanje PCR v spekter raziskovalnih viroloških metod se pripisuje predvsem majhnosti virusnega genoma in posledičnemu, relativno dobremu poznavanju genomskega zaporedja večine pomembnejših virusov, kar je, kot je bilo že večkrat omenjeno, glavni predpogoj za uspešno izvajanje reakcije (4, 25).

Na žalost pa prenos te visoko specifične in občutljive metode iz raziskovalnih v diagnostične virološke laboratorije ne poteka tako hitro in enostavno, kot bi si mnogi želeli (2, 28, 40). Lahkotnost, s katero se je ponašala ta metoda v raziskovalnih laboratorijih (zlasti po zgodnjih poročilih), se je v primeru testiranja večjega števila vzorcev na istem mestu v kratkem času (značilnost diagnostičnega laboratorija) kmalu pokazala kot »neznosna lahkotnost«. Relativno pogost pojav lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov je namreč po začetnem navdušenju v večini diagnostičnih laboratorijev privedel do znatne omejitve uporabe te metode v diagnostične namene. Dodatno skrb so zbujala tudi poročila o neprimerljivosti rezultatov med različnimi laboratoriji ter pogosti neuporabnosti enakih začetnih oligonukleotidov za določen virus v različnih delih sveta (posledica genetske različnosti virusov) (2, 29). Med tovrstnimi primerjalnimi študijami je bila posebej zaskrbljujoče odmevna nedavna študija Zaaierja in sodelavcev, v kateri so ugotovili, da je le 5 od 31 testiranih »vrhunskih« PCR-laboratorijev z vsega sveta brezhibno opredelilo prisotnost virusa hepatitisa C v 12 poslanih kliničnih vzorcih (48).

Večino navedenih problemov v diagnostičnih laboratorijih razlagajo kot posledico prehitrega razvoja metode, ki mu ni sledil dovolj hiter razvoj ustreznih standardiziranih diagnostičnih kemikalij in kontrolnih vzorcev ter služb za nadzor nad kvaliteto dela (2, 28). Zato je po mnenju večine avtorjev pri diagnostični razlagi rezultatov reakcije PCR, dokler ni razvitih omenjenih kontrolnih mehanizmov, potrebna skrajna previdnost. Zaradi istih razlogov mora biti zaenkrat izvajanje PCR v diagnostične namene omejeno samo na maloštevilne laboratorije z visoko izurjenim laboratorijskim osebjem (2, 29).

Kmalu po odkupu vseh tehničnih, patentnih in prodajnih pravic za uporabo PCR na vseh področjih biomedicine, vključno z virologijo, je družba Hoffman-La Roche prevzela na-



Tabela 1. Pregled ključnih PCR-raziskav na področju virologije

Virus	Izhodiščni material	Viri
Humani virusi imunske pomanjkljivosti (HIV 1 in 2)	limfociti, serum, slina, urin, endoskopski brisi, zmrznjeni in fiksirani biopsijski in avtopsijski tkivni vzorci, krvni pripravki	(49–53)
HTLV 1 in 2	limfociti, fetalna kri	(54, 55)
Rotavirusi	blato	(56, 57)
Virusi influence A, B in C	okužene celične kulture	(58)
Humani parvovirus B 19	serum, krvni pripravki, amnijska tekočina, fetalna kri	(59–61)
Rinovirusi	brisi nosu in žrela	(62)
Adenovirusi	blato	(63, 64)
Enterovirusi	likvor	(65)
Virusa herpes simpleksa (HSV 1 in 2)	likvor, zmrznjeni in fiksirani biopsijski in avtopsijski tkivni vzorci	(66–68)
Citomegalovirus	urin, periferna kri, kostni mozeg, zmrznjeni in fiksirani biopsijski in avtopsijski vzorci	(69, 70)
Virus ošpic	likvor, zmrznjeni in fiksirani biopsijski in avtopsijski tkivni vzorci	(71)
Virus Epstein-Barr (EBV)	zmrznjeni in fiksirani biopsijski in avtopsijski tkivni vzorci, periferna kri	(72, 73)
Humani virusi polioma (BK in JC)	urin, likvor	(74, 75)
Humani virusi papiloma (HPV)	sveži, zmrznjeni in fiksirani biopsijski in avtopsijski tkivni vzorci tumorjev, brisi materničnega vratu	(32, 76)
Virus mumpsa	okužene celične kulture	(77)
Hantavirusi	urin, bronhoalveolarni izpirek, avtopsijski tkivni vzorci, tkivni vzorci živalskih gostiteljev	(35, 78–80)
Virus hepatitisa A	koncentrat rečne vode	(81)
Virus hepatitisa B	periferna kri, fetalna kri, kolostrum, biopsijski in avtopsijski tkivni vzorci	(82–84)
Virus hepatitisa C	serum, slina, seč, blato, semenska in ascitesna tekočina, biopsijski in avtopsijski tkivni vzorci	(36, 37, 85–88)
Virus zahodnega Nila	okužene celične kulture	(89, 90)
Virusi denge 1–4	serum, komarji	(90–93)
Virus rumene mrzlice	okužene celične kulture	(90–92)
Virus japonskega encefalitisa	okužene celične kulture	(90–92)
Virus encefalitisa St. Louis	okužene celične kulture	(91, 92)
Virus encefalitisa doline Murray	okužene celične kulture	(91, 92)
Virus klopnega meningoencefalitisa	kri, klopi	(38, 90)

se razvoj visoko standardiziranih diagnostičnih kitov, ki bodo odprli možnost širše in zanesljivejše uporabe te metode. Eden od rezultatov raziskovalnih naporov številnih raziskovalcev omenjene družbe so prvi standardizirani testi za odkrivanje virusnih okužb z zaščitenim imenom Amplicor®, ki so se pojavili na evropskem tržišču konec leta 1993. To so testi za odkrivanje provirusne DNA virusov HIV-1 in HIV-2 v krvi, ter specifične virusne RNA virusa hepatitisa C v serumu bolnikov. Po prvih poročilih nekaterih evropskih diagnostičnih laboratorijev in naših lastnih izkušnjah lahko rečemo, da so Amplicor testi hitri, visoko občutljivi in specifični ter primerni za rutinsko uporabo v specializiranih molekularno mikrobioloških laboratorijih (2, 17, 22). Podobne teste nameravajo v naslednjih petih letih razviti za večino medicinsko pomembnih virusov, tako npr. za letošnje leto obljublja še standardizirane PCR teste za odkrivanje okužbe z enterovirusi in testa za kvantifikacijo HIV-1 provirusne DNA ter RNA virusa hepatitisa C.

## Sklep

Po mnenju večine avtorjev se metoda tudi po razvoju standardiziranih, komercialno dosegljivih PCR-testov vsaj za nekaj časa ne bo zelo pogosto uporabljala v diagnostični virologiji, ampak bo ostala rezervirana samo za razreševanje določenih problemov, ki jih z drugimi, starejšimi virološkimi tehnikami ne moremo dovolj dobro razjasniti:

- odkrivanje zgodnje faze virusne okužbe pred pojavom specifičnega imunskega odgovora oz. serokonverzije;
- opredelitev pomena dokazanih specifičnih antivirusnih protiteles v bolnikovem serumu (razlikovanje bolnikov z aktivno virusno okužbo od bolnikov po preboleli okužbi), kjer le-to s klasičnimi virološkimi tehnikami ni mogoče (ni razvitih testov za odkrivanje specifičnih protiteles razreda IgM, ni testov za odkrivanje virusnega antigena, ni zadovoljivih postopkov za osamitev virusa);
- zanesljivo dokazovanje virusne okužbe pri bolnikih z nerazvitim ali okvarjenim imunskim sistemom;
- razlikovanje prave virusne okužbe od pasivnega prenosa antivirusnih protiteles pri prejemnikih krvnih pripravkov in novorojencih;
- neposredno odkrivanje virusov, za katere je poskus izolacije premalo občutljiv, nevaren ali dolgotrajen;
- odkrivanje in kvantifikacija viremije;
- spremljanje protivirusnega zdravljenja;
- odkrivanje prisotnosti virusov v kliničnih materialih, kjer so klasične neposredne diagnostične metode neuspešne (fiksirani avtopsijski in biopsijski tkivni vzorci, citološki preparati, arhivski klinični materiali);
- etiološka razjasnitev do sedaj etiološko nepopolno opredeljenih bolezni, pri katerih so, med drugim, našli antivirusna protitelesa;
- molekularno-epidemiološke študije (spoznavanje virusov prisotnih na določenem področju sveta, kar je med drugim pomembno tudi za razvoj učinkovitih protivirusnih cepiv ter za ugotavljanje sevov, odpornih na protivirusna zdravila);
- študij patologije in patogeneze virusnih okužb.

Seveda bosta šele čas in širša uporaba PCR pokazala njegovo pravo mesto v diagnostični virologiji in upravičenost naših trenutno visokih pričakovanj, povezanih s to metodo.

## Literatura

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350–4.
2. Persing DH. Diagnostic molecular microbiology. Current challenges and future directions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 159–63.
3. Rogers BB. Nucleic acid amplification and infectious disease. *Human Pathol* 1994; 6: 591–3.
4. Templeton NS. The polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 58–72.
5. Avšič-Županc T. *Antigenske lastnosti hantavirusa Dobrava in njegova patogenost*. Doktorska disertacija. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1991.
6. Avšič-Županc T, Xiao SY, Stojanović R, Gligić A, van der Groen G, LeDuc JW. Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia. *J Med Virol* 1992; 38: 132–7.
7. Xiao SY, Diglišić G, Avšič-Županc T, LeDuc JW. Dobrava virus as a new hantavirus: evidenced by comparative sequence analysis. *J Med Virol* 1993; 39: 152–5.
8. Avšič-Županc T, Trilar T, Poljak M, Likar M. Biologija uzročnika hemoragične groznice s bubrežnim sindromom. *Praxis veterinaria* 1993; 41: 37–3.
9. Poljak M, Gale N, Ferluga D, Kambič V. Etiology of laryngeal papillomatosis. *Il Friuli Medico* 1992; 47: 461–2.
10. Poljak M, Ferluga D, Gale N, Petrovec M. Molekularna diagnostika okužbe s humanim virusom papiloma (HVP) v patologiji. *Zdrav Vestn* 1993; 62: 105–9.
11. Gall K, Pavelić J, Jadro-Šantel D, Poljak M, Pavelić K. DNA amplification by polymerase chain reaction from brain tissues embedded in paraffin. *Int J Exp Pathol* 1993; 74: 333–7.
12. Poljak M, Cerar A. Human papillomavirus type 16 DNA in oesophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1993; 13: 2113–6.
13. Poljak M, Cerar A. Detection of human papilloma virus type 6 DNA in a case of esophageal squamous cell papilloma. *Eur J Clin Microbiol & Infect Dis* 1993; 13: 188–9.
14. Poljak M. *Tipizacija hantavirusa s pomoću lančane reakcije polimeraze*. Magistrska naloga. Zagreb: Medicinski fakultet, 1993.
15. Avšič-Županc T, Poljak M, Lavrenčak J, Kryštufek B, Trilar T. Study of molecular epidemiology of hantavirus infection in small mammals by polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: Suppl 3: 195.
16. Avšič-Županc T, Poljak M. Uporaba metod molekularne virologije pri raziskovanju etiologije klopnega meningoencefalitisa. In: *Klopni meningitis – Zbornik Bedjaničevega simpozija*. Celje: Infektološka sekcija SZD, 1993: 61–6.
17. Seme K, Poljak M, Avšič-Županc T. Sodobna diagnostika okužbe z virusom hepatitis C. *Med Razgl* 1994; 33: 89–103.
18. Ovčak S. *HIV 1 specifična DNA v diagnozi AIDS-a*. Doktorska naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1991.
19. Avšič-Županc T, Poljak M. Hantavirus genomic variation and disease distribution. *Zdrav Vestn* 1994; 63: Suppl 2: 25–27.
20. Avšič-Županc T, Poljak M, Furlan P, Kapš R, Xiao S-Y, LeDuc JW. Isolation of a strain of a Hantaan virus from a fatal case of hemorrhagic fever with renal syndrome in Slovenia. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 393–400.
21. Poljak M, Barlič J. Rapid and simple method for extraction of DNA from archival Papanicolaou stained cervical smears. *Acta Cytol* (v tisku).
22. Seme K, Poljak M, Žužek-Rešek S, Avšič-Županc T. High prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one dialysis unit in Slovenia. *Nephron* 1994; 67 (v tisku).

23. Poljak M, Barlič J, Seme K, Avšič-Županc T, Zore A. Isolation of DNA from archival Papanicolaou stained cytological smears using simple salting-out procedure. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995; 48: M55–M56.
24. Gale N, Poljak M, Kambič V, Ferluga D, Fischinger J. Laryngeal papillomatosis: molecular, histopathologic, and clinical evaluation. *Virchows Arch* 1994; 425: 291–295.
25. Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA. Theory and applications of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: Suppl 1: 49–54.
26. Eeles RA, Warren W, Stamps A. The PCR revolution. *Eur J Cancer* 1992; 28: 289–93.
27. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56–65.
28. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microb* 1991; 29: 1281–5.
29. Kitchin PA, Bootman JS. Quality control of the polymerase chain reaction. *Med Virol* 1993; 3: 107–14.
30. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237–8.
31. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487–91.
32. Van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2739–43.
33. Inouye S, Hondo R. Microplate hybridization of amplified DNA segment. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1469–72.
34. Keller GH, Huang D-P, Manak MM. A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. *Anal Biochem* 1989; 177: 27–32.
35. Grankvist O, Juto P, Settergren B et al. Detection of nephropathia epidemica virus RNA in patients samples using a nested primer-based polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1992; 165: 934–7.
36. Garson JA, Tedder RS, Briggs M et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by »nested« polymerase chain reaction. *Lancet* 1990; 335: 1419–22.
37. Sallie R, Rayner A, Portmann B, Eddleston ALWF, Williams R. Detection of hepatitis C virus in formalin-fixed liver tissue by nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37: 310–4.
38. Ramelow C, Suss J, Berndt D, Roggendorf M, Schreier E. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993; 45: 115–9.
39. Rys PN, Pershing DH. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2356–60.
40. Victor T, Jordaan A, du Toit R, van Helden PD. Laboratory experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 531–5.
41. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93: 125–8.
42. Cimino GD, Metchette KC, Tessman JW, Hearst JE, Isaac ST. Post-PCR sterilisation: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 99–107.
43. Paabo S. Ancient DNA. *Sci Am*. 1993; 269: 60–6.
44. Changue E, Roshe C, Lefevre MF, Barbazan P, Chanteau S. Ultra-rapid, simple, sensitive, and economical silica method for extraction of dengue viral RNA from specimens and mosquitoes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1993; 40: 142–5.
45. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RI, Rutter WJ. Isolation of biological active RNA from sources enriched in ribonuclease. *J Biochem* 1979; 18: 5294–5.
46. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9.
47. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991; 30: 7661–6.
48. Zaaier HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkler IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 341: 722–4.
49. Semple MG, Loveday C, Preston E, Tedder RS. Detection of HIV-1 RNA in factor VIII concentrate. *AIDS* 1991; 5: 597–609.

50. Boni J, Emmerich BS, Leib SL, Wiestler OD, Schupbach J, Kleihues P. PCR identification of HIV-1 DNA sequences in brain tissue of patients with AIDS encephalopathy. *Neurology* 1993; 43: 1813–7.
51. Ou C-Y, Kwok S, Mitchell SW et al. DNA amplification for detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 238: 295–7.
52. Schochetman G. Diagnosis of HIV infection. *Clin Chim Acta* 1992; 211: 1–26.
53. Larder BA, Kellam P, Kemp SD. Zidovudine (AZT) resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from human immunodeficiency virus infected lymphocytes. *AIDS* 1991; 5: 137–44.
54. Tuke PW, Luton P, Garson JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of 'nested' PCR products. *J Virol Methods* 1992; 40: 163–74.
55. Saito S, Furuki K, Ando Y et al. Identification of HTLV-I sequence in cord blood mononuclear cells of neonates born to HTLV-I antigen/antibody-positive mothers by polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 890–5.
56. Iizuka M, Mitsuro C, Masamune O, Gerna G, Nakagomi O. Molecular characterisation of human rotavirus VP4 genes by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 729–35.
57. Ushijima H, Koike H, Mukoyama A, Hesegawa A, Nishimura S, Gentsch J. Detection and serotyping of rotaviruses in stool specimens by using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 1992; 38: 292–7.
58. Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, van Beek R, Quint WGV, Masurel N. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992; 39: 1–13.
59. Musiani M, Azzi A, Zerbini M et al. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of B19 Parvovirus DNA in human immunodeficiency virus patients. *J Med Virol* 1993; 40: 157–60.
60. McOmish F, Yap PL, Jordan A, Hart H, Cohen BJ, Simmonds J. Detection of parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 323–8.
61. Torok TJ, Wang Q-Y, Gary GW jr., Yang C-F, Finch TM, Anderson LJ. Prenatal diagnosis of intrauterine infection with parvovirus B19 by the polymerase chain reaction technique. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 149–55.
62. Gama RE, Hughes PJ, Bruce CB, Stanway G. Polymerase chain reaction amplification of rhinovirus nucleic acids from clinical material. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 9346.
63. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 37: 149–57.
64. Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2659–67.
65. Rotbart HA. Diagnosis of enteroviral meningitis with polymerase chain reaction. *J Pediatr* 1990; 117: 85–9.
66. Anderson NE, Powell KF, Croxson MC. A polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid in patients with suspected herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56: 520–5.
67. Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Forsgren H. Encephalitis in immunocompetent patients due to herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type I specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. *J Med Virol* 1993; 39: 179–86.
68. Gressens P, Langston C, Mitchell WJ, Martin JR. Detection of viral DNA in neonatal herpes encephalitis autopsy tissues by solution-phase PCR: comparison with pathology and immunohistochemistry. *Brain Pathol* 1993; 3: 237–50.
69. Smith KL, Dunstan RA. PCR detection of cytomegalovirus: a review. *Brit J Haematol* 1993; 84: 187–90.
70. Roseff SD, Rockis M, Keiser JF et al. Optimisation for detection of cytomegalovirus by the polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples. *J Virol Methods* 1993; 42: 137–46.
71. Godec MS, Asher DM, Swoveland PT. Detection of measles virus genomic sequence in SSPE brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1990; 30: 327–44.
72. Akao I, Sato Y, Mukai K et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue of nasopharyngeal carcinoma using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Laryngoscope* 1991; 101: 279–84.

73. Saito I, Serenius B, Compton T, Fox RI. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patient with Sjogren's syndrome. *J Exp Med* 1989; 169: 2191-8.
74. Marshall WF, Telenti A, Proper J, Aksamit AJ, Smith TF. Survey of urine from transplant recipient for polyomaviruses JC and BK using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1991; 5: 125-8.
75. Gibson PA, Knowles WA, Hand JF, Brown DWG. Detection of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Med Virol* 1993; 39: 278-81.
76. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK et al. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1477-84.
77. Boriskin YS, Booth JC, Yamada A. Rapid detection of mumps virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993; 42: 23-32.
78. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 1993; 262: 914-7.
79. Xiao SY, Chu AK, Knauert FK et al. Comparison of hantavirus isolates using a genus-reactive primer pair polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1992; 73: 567-73.
80. Puthavathana P, Lee HW, Kang CY. Typing of hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction. *Virus Res* 1992; 26: 1-14.
81. Morace G, Pisani G, Divizia M, Pana A. Detection of hepatitis A virus in concentrated river water by polymerase chain reaction. *Zbl Hyg* 1993; 193: 521-7.
82. Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 312-6.
83. Mitsuda T, Yokota S, Mori T et al. Demonstration of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus by means of polymerase chain reaction. *Lancet* 1989; 2: 886-8.
84. Lo YMD, Mehal WZ, Fleming KA. In vitro amplification of hepatitis B virus sequences from liver tumor DNA and from paraffin wax embedded tissues using polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1989; 42: 840-6.
85. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 187-91.
86. Castillo I, Bartolome J, Quiroga JA, Carreno V. Comparison of several PCR procedures for detection of serum HCV-RNA using different regions of the HCV genome. *J Virol Methods* 1992; 38: 71-80.
87. Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992; 37: 197-202.
88. Gerber MA, Shieh YSC, Shim K-S et al. Detection of replicative hepatitis C virus sequences in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1992; 141: 1271-7.
89. Porter KR, Summers PL, Dubois D et al. Detection of West Nile virus by the polymerase chain reaction and analysis of nucleotide sequence variation. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 440-6.
90. Whitby JE, Ni H, Whitby HE et al. Rapid detection of viruses of the tick-borne encephalitis virus complex by RT-PCR of viral RNA. *J Virol Methods* 1993; 45: 103-14.
91. Eldadah ZA, Asher DM, Godec MS et al. Detection of Flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1991; 33: 260-7.
92. Tanaka M. Rapid identification of flaviviruses using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993; 41: 311-22.
93. Maneekarn N, Morita K, Tanaka M et al. Applications of polymerase chain reaction for identification of Dengue viruses isolated from patient sera. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 41-7.