Új módszerek a HIV direkt kimutatására vérplazmában

Cikk: Dr. Ujhelyi Eszter (OHVII, Budapest)

A HIV fertőzés igazolása még ma is elsősorban a specifikus ellenanyagok kimutatásán alapul. Ez azzal magyarázható, hogy a szerokonverzió után, a betegség epidemiológiai időtartama során ezek az antitestek jelen vannak, míg szabad vírus antigén csak a szerokonverzió előtt igen rövid ideig, néhány napig, és a betegség előrehaladott stádiumában mutatható ki. Az AIDS kutatás eredményei és az anti-HIV terápia igényei azonban nyilvánvalóvá tették, hogy szükség van a HIV vírus közvetlen kimutatására és mennyiségének meghatározására a betegek vérében. Ennek indokai a következőkben lehetnek:

a) Az új antivirális szerek kipróbálását rendkívüli mértékben megnyomorítaja az, ha e szerek hatékonyságát nem csak a klinikai paramétereik (a CD4 + sejtszám alakulása, az AIDS kifejlődése, az AIDS okozta halálozás) alapján ítélnék meg, mivel ebben az esetben hosszú évekig kell az eredményre várni. Ha a szer hatékony, akkor az várható tőle, hogy gyorsan és jelentős mértékben csökkenti a HIV szervezetben lévő össz-mennyiségét, amelyet jól tükröz a vérplazmában lévő HIV partikulák, ill. a HIV-RNS mennyisége. Ugyanakkor a kezelésre használt szer iránti rezisztencia kifejlődését a HIV mennyiségének ismételt növekedése kísért a szervezetben (l. a következő cikket).

b) A legújabb vizsgálatok szerint, a HIV össz-mennyiség emelkedése a szervezetben a HIV betegség progressziójával a legerősebben korrelláló laboratóriumi marker, ezért a plazmában jelenlévő HIV mennyiség meghatározására felhasználható prediktív eljárásokat is.

c) A HIV direkt mérésével a betegben, és állatkísérletes modellekben igen lényeges, a betegség mechanizmusaira vonatkozó ismeretek nyerhetők.
d) Elméleti szempontból, és egyes esetekben, a gyakorlatban is fontos lehet a vírus vagy a vírus antigének közvetlen kimutatása a HIV fertőzés igazolására a szerokonverzió előtti időszakban.
e) Az anyai eredetű antitestek jelenléte miatt az ellenanyag kimutatásán alapuló diagnosztika nem alkalmas annak az eldöntésére, hogy egy HIV fertőzött anya újszülöttje fertőzötten született-e vagy sem. Ilyenkor is a vírus vagy a vírus-antigén direkt kimutatása a leghasználhatóbb eljárás.

A HIV-nek a vérplazmában való mérésére többféle eljárás is lehetséges.
A leggyakrabban használt eljárás természetesen a vírus izolálása, azonban tömeges alkalmazhatóságának határt szab relatíve alacsony szenzitivitása, munkaigényessége és költségessége.
A HIV-antigének közül elsősorban a p24 core antigén vírusonkénti való kimutatása terjedt el, mivel a p24 megjelenése a betegség késői stádiumában régóta ismert prognosztikai, az AIDS kifejlődését előrejelző marker. A HIV-betegség tünetes stádiumában, ill. a HIV pozitív anyák újszülöttjeiben azonban a p24 antigén nincs jelen szabad formában, hanem ellenanyaghoz kötve, immunkomplex formájában kering. Ezért több cég is kidolgozott olyan eljárásokat, melyek a p24 antigént - alacsony pH-n történő kezelés segítségével - az immunkomplexből felszabadítják, és mérhetővé teszik. Ezek a módszerek általában azon az elven alapulnak, hogy a savkezelés az antitesteket elroncsolja, a p24 antigén azonban teljesen vagy részben intakt marad. Az ilyen eljárásokat, pl. a Coulter cég kitjét eredményesen alkalmazzák a HIV fertőzöttség igazolására HIV pozitív anyák újszülöttjeiben, azonban e módszerek nem eléggé érzékenyek az antivirális terápia monitorozására.

A vérplazma HIV tartalmának meghatározására a jövőben nagy valószínűséggel elsősorban a HIV-RNS mérését fogják alkalmazni. E célra a későbbiek és klinikai vizsgálatokban is már hosszú évek óta használják az un. PCR (polymerase chain reaction) módszert. Ennek lényege az, hogy megfelelő eljárás segítségével a HIV-RNS meghatározott, un. primerek által kijelölt szakaszait megsokszorozzák (egy molekulából kb. 1 millió másolatot készítenek), és az amplifikált terméket mérik.
A PCR eljárásnak azonban több hátránya van: a) speciális, gyors hőmérsékletváltoztatásokat lehetővé tevő készülékeket igényel, b) nehezen tehető kvantitatívvá, c) minimális szennyezés is ál-pozitív eredményeket okozhat. Ezt follemerve, a különböző cégek a legutóbbi időben olyan eljárásokat dolgoztak ki, melyek a PCR technika hátrányait kiküszöbölik, és ugyanakkor előrik, sőt meg is haladják ennek érzékenységét. Két ilyen eljárást szeretnék a továbbiakban ismertetni, melyek valószínűleg már a közeljövőben nagy jelentőségűek lesznek a klinikai gyakorlatban.

1. A HIV-1 RNS humán plazmában történő kimutatására szolgáló egyik eljárást az amerikai CHIRON cég dolgozta ki. A módszer az un. ?branched DNA signal amplification assay?-e alapul és a kit Quantiplex TM HIV-RNA assay néven kerül forgalomba.
A branched (elágaztatott) DNA (bDNA) amplifikációs eljárás olykép különbözik a PCR reakciótól. Az utóbbi módszer azon alapul, hogy a vírus genom nukleinsavait enzimatikus reakció segítségével sokszorozzuk meg, hasonlóan ahhoz, ahogy ez a sejten belül, a vírus-replikáció során történik. Ezzel ellentétben a bDNA assay az un. jel-amplifikációs problémák közé tartozik. A reakció folyamán a vírus nukleinsavakat, pl. a HIV-RNS molekulákat nem sokszorozzuk meg, hanem a vizsgálandó anyagban (pl. a vérplazmában) természetesen jelenlévő koncentrációban utólard fizikokhoz kötik. Az amplifikációt ezután úgy érik el, hogy egy RNS molekulához hozzá specifikusan kötődő oligonukleotid DNS struktúrára keresztül nagyszámú, több, mint 1000 jel-molekulát, pl. alkalikus foszfatázt kötnek. Végül az enzimmel jelzett DNS struktúrákat egy szubsztrát hozzáadása után az igen érzékeny chemil lumineszcenciás reakció segítségével mutatják ki, és mérik ilyen módon a vizsgált mintában jelenlévő specifikus RNS mennyiségét.

A cég eddig a HIV-RNS-en kívül a HCV-RNS és a HBV-DNS kimutatására hozott forgalomba a bDNA assay-o alapuló kiteket. A módszer előnyei: minimálisnak válik a contaminatio által okozott ál-pozitív reakciók veszélye, az eljárás olcsóbb, mint a PCR, és az eredmények kvantitatívak. A bDNA assay segítségével már 1000 vírus partikula jelenléte is kimutatható a vizsgált plazmamintában.
A Quantiplex TM assay-val végzett vizsgálat menete a következő:
a) a plazma centrifugálása 23500 p.s. hűtött asztali centrifugában,
b) az üledékben lévő vírus lízálása, az RNS-t bontó enzimek elroncsolása, és az RNS felszabadítása. Az így kezelt mintát centrifugálás után azonnal 96 lyukat tartalmazó mikrotitrált lemezek a HIV-RNS-t specifikusan kötő un. capture reagenseikkel fedett mélyedésekbe kell pipettázni. 53 oC-on történő, éjszakán át tartó inkubálás során a vírus-RNS a lízátumból a lemezekhez kötődik,

c) mosás után a megsokszorozésként (amplifier) szolgáló elágaztatott DNS molekulákat pipettázzuk a mélyedésekbe, melyek specifikusan kapcsolódnak a lemezhez kötött vírus RNS-hez,
d) újabb mosás után bepipettázzuk az alkalikus foszfatázzal jelzett reagenst, melyek az elágaztató DNS ?linker?-hez kapcsolódnak,
e) végül a chemilumineszcenciális szubsztrát (dioxetan) adagolása fény felvillanást eredményez, amely luminométeren leolvasható.A fénykibocsátás a vizsgált mintában jelenlévő vírus-RNS mennyiségével egyenesen arányos.

2. Az ORGANON TEKNIKA cég 1994-es nagy metodikai áttörése volt a NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) módszeren alapuló HIV-RNS mérési kit bevezetése.

A NASBA rendszer, hasonlóan a Chiron Quantiplex tesztjéhez, a HIV-1 RNS-t plazmából mutatja ki. Két változát hoztak forgalomba. Az egyik, a HIV-1 NASBTM kvalitatív módszer, a HIV-RNS igen kis mennyiségét (10-100 HIV-1 RNS molekulát) képes detektálni, de kvantitatív meghatározásra nem alkalmas. A másik variáns, a NASBA HIV-1 RNA QT szintén igen érzékeny, mintánként 600 HIV-1 RNS képát lehet kimutatni alkalmazásával, és igen pontos kvantitatív meghatározást tesz lehetővé szélesdinamikatartományban.

A két variánsban alkalmazott kezdeti lépések azonosak. Ezeknek lényege, az alapul szolgáló NASBA módszernek megfelelően, a következő: különböző enzimek és a HIV-1 RNS egy adott szakaszának két végéhez kapcsolódni képes primerek keverékét adják a vizsgálati mintához. Ezután a mintában jelenlévő HIV-RNS-ek a primerek által kiválasztott szakaszához DNS hibridizálódik, melynek lánca az RNS-sel komplementer. Ezután az eredeti RNS-t enzimatikusan elroncsolják, majd a DNS-ről kb. 100 RNS másolat készül egy másik enzim segítségével. Ekkor az egész folyamat előlről kezdődik. Ily módon 4-5 ciklus után 1 RNS molekulából 1 milliárd körüli kópia készül.

A módszer 3 fő előnye: a) Nem érzékeny a DNS kontaminációra, ezért igen specifikus, b) a PCR reakcióval szemben, amely minden ciklus során hőmérséklet változtatásokat igényel, a NASBA reakció végig azonos hőmérsékleten, 42 oC-on játszódik le, c) Lényegesen kevesebb ciklussal ér el azonos mértékű amplifikációt, mint a PCR, és így csökken a ciklusok számával egyenesen arányos hibás kópiák száma.

A két HIV-1 NASBA próba még egy speciális ?trükköt? alkalmaz: a vizsgálati mintában található ?real típusú? RNS-sel együtt megszakozorra (ko-amplifikál) háromféle, a vad típustól csak néhány nucleotidban különböző, kalibrátorként szolgáló RNS molekulát is, és ezek arányából következtetet vissza a HIV-1 RNS eredeti mennyiségére a vizsgált mintában.

A kvalitatív teszt az un. ELGA (enzyme linked gel assay) segítségével mutatja ki az amplifikált minta- és kalibrátor-RNS termékeket. A detektálás torma-peroxidáz próbával való hibridizáláson alapul, a leolvasás szabad szemmel történik.

A kvantitatív tesztben az amplifikált vad típusú és kalibrátor RNS reagenseket egy rendkívül érzékeny eljárás, az un. electro-chemilumineszcencia segítségével mutatjuk ki. A mérés speciális automata készülékben történik.

A gyártó cég szerint a kvantitatív eljárás alkalmas a betegség progressziójának monitorozására és előrejelzésére, valamint a gyógyszer- és vakcinakipróbálások céljára. Mindkét eljárás rövid idő, 5 óra alatt végrehajtható.

A cikk elején részletesen ismertetett felhasználási lehetőségek érthetővé teszik a cégek érdeklődését a HIV-1 RNS mérési eljárások iránt. Ezért már a közeljövőben várható ugyanerre a célra szolgáló másféle diagnosztikai készletek forgalomba hozatala.