

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion Matemaattis-luonnontieteellinen tk.		Laitos – Institution Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare Laura Mannonen			
Työn nimi – Arbetets titel Ihmisen herpesvirus 6:n kvantitointi PCR-menetelmän avulla			
Oppiaine – Läroämne yleinen mikrobiologia			
Työn laji – Arbetets art pro gradu -tutkielma		Aika – Datum toukokuu 1997	Sivumäärä – Sidoantal 46
Tiivistelmä – Referat			
<p><i>Herpesviridae</i> sukuun kuuluva ihmisen herpesvirus 6 (HHV-6) löydettiin vuonna 1986 AIDS ja leukemia/lymfooma potilaiden perifeerisen veren mononuklearisista soluista. Aluksi HHV-6:ta pidettiin Epstein-Barrin viruksen tavoin gammaherpesviruksena lymfotropismista johtuen. Pian sen huomattiin muistuttavan geneettisesti eniten ihmisen sytomegalovirusta, mikä johti sen sijoittamiseen betaherpesvirusryhmään. HHV-6 tunnetaan parhaiten vauvarokon eli exanthema subitumin aiheuttajana, jossa 3-5 päivää kestävää kuumetta seuraa 1-3 päivää kestävä ihottuma. Vauvarokkoon liittyviä komplikaatioita on raportoitu runsaasti ja HHV-6 infektio onkin yleisin pienten lasten päivystyspoliklinikkakäynteihin johtava infektio. Luuytimensiirtopotilailla HHV-6 voi aiheuttaa vakavan pneumoniitin ja sillä on ilmeisesti osuutta myös siirretyn luuytimen suppressiotiloissa. HHV-6 on liitetty myös pesäkekovettumatautiin (multippeli skleroosi) ja krooniseen väsymysoireyhtymään.</p> <p>HHV-6:n seropositiivisuus väestössä on korkea. Yli 2-vuotiaan väestön seropositiivisuus on noin 90%. Muiden herpesvirusten tavoin sillä on taipumus jäädä latentiksi elimistöön. Näistä seikoista johtuen vain testit, jotka osoittavat infektion aktiivisuuden ovat käyttökelpoisia muita kuin primaari-infektioita tutkittaessa. Kvantitatiivisen HHV-6 PCR-menetelmän avulla voidaan vetää johtopäätöksiä infektion luonteesta. Vaikka se ei olekaan suora osoitus DNA:n replikaatiosta, voidaan todetun virusmäärän perusteella arvioida, onko kyseessä tuottava eli aktiivi vai latentti infektio.</p> <p>Haartman Instituutin virologian osastolla on diagnostiikassa käytössä alukkeet, jotka monistavat 223 emäsparin jakson HHV-6:n geenin U67 alueelta. Tässä työssä suunniteltiin ja valmistettiin sisäinen ja ulkoinen standardimolekyyli käytössä olevalle kvalitatiiviselle testille kvantitaatiota ajatellen. Sisäisen standardin sekvenssi valittiin plasmidista pGEM-3Z ja suunniteltiin yhdistelmäalukkeet, joilla sekvenssi monistettiin. Ulkoinen standardisekvenssi valmistettiin monistamalla villityyppistä sekvenssiä HHV-6 spesifeillä alukkeilla. Standardisekvenssit kloonattiin pCR 2.1 vektoriin ja transformoitiin <i>E. coli</i> INVαF⁻-kantaan, jossa niitä lisättiin. Plasmidit eristettiin soluista ja niiden lukumäärä määritettiin spektrofotometrisesti. 100 sisäistä standardimolekyyliä, joka sisältää HHV-6 alukkeiden tunnistuskohdat, monistetaan samassa putkessa näytteen kanssa. Näytteen signaalin suhde sisäisen standardin signaaliin voidaan laskea ja sijoittaa standardisuoralle, joka rakentuu 10⁻¹⁰ ulkoisen ja 100 sisäisen standardimolekyylin suhteesta. Näin saadaan korjatuksi esim. DNA-polymeraasi inhibiittorien läsnäolosta johtuva monistustehokkuuden vaihtelu. PCR-tuote kvantitoidaan hybridisaatiolla mikrotitterilevyllä käyttäen kemiluminenssia. Tässä työssä optimoitiin hybridisaatio-olosuhteet kvantitaatioon sopiviksi ja validoitiin kvantitatiivinen PCR-menetelmä.</p> <p>Mikrotitterilevyllä tapahtuva hybridisaatio on erinomainen menetelmä PCR-tuotteen kvantitaatioon. Se on teknisesti helppo ja sen lineaarisuus on loistava (korrelaatiokerroin 0,99). Kvantitatiivisella PCR-menetelmällä voitiin yhdessä reaktiossa määrittää 10⁻¹⁰ genomiekvivalenttia. Testin sisäinen vaihtelu saman näytteen sisällä (noin 1000 genomiekvivalenttia sisältävälle näytelle) oli 7-21% (100 * variaatiokerroin) ja testien välillä 24%, joten se pystyy luotettavasti määrittämään HHV-6 infektion tason. Testiä voidaan käyttää selvitetessä primaari-infektioiden ja rekurrensien suhdetta, HHV-6:n merkitystä kuumekeuhkustuksissa sekä eräissä kroonisissa taudeissa, kun seurataan HHV-6:n aktiivisuutta luuytimensiirron jälkeen ja antiviraalisen tai muun hoidon tehoa seurattaessa.</p>			
Avainsanat - Nyckelord Ihmisen herpesvirus 6, PCR, kvantitointi, hybridisaatio, mikrotitterilevy			
Säilytyspaikka - Förvaringställe Yleisen mikrobiologian osaston kirjasto			
Muuta tietoja Työ on tehty Helsingin Yliopiston Haartman Instituutin virologian-osastolla. Ohjaajat dos. Marjaleena Koskiniemi ja prof. Antti Vaheri			