

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Diagnostika viru hepatitidy C pomocí molekulárně
biologických metod**

bakalářská práce

Autor práce: Markéta Jakubcová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Vedoucí práce: Ing. Natalia Piskunova CSc.

Datum odevzdání práce:

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Diagnostika viru hepatitidy C s použitím metod molekulární biologie vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použité literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích.....

podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu v laboratoři molekulární biologie a genetiky (v Nemocnici ČB a.s.), především za spolupráci a za umožnění výzkumu k mé bakalářské práci. Dále chci poděkovat mé vedoucí Ing. Natalii Piskunové a Mgr. Pavlu Trubačovi za čas, který mi byli ochotni obětovat.

Abstrakt

Hepatitida C je zánět jater vyvolaný infekcí stejnojmenným virem, který ve 25% případů končí hepatocelulárním karcinomem. V současnosti se rozeznává na 6 různých genotypů s nejméně 50 odlišnými subtypy (3). Virus hepatitidy C rychle podléhá mutacím, výsledkem je, že každý infikovaný jedinec obsahuje směs lehce odlišných variant viru. Unikají kontrole imunitního systému hostitele a z tohoto důvodu často přechází do chronicity. Kvalitativní průkaz je důležitý při zjištění přítomnosti viru, stanovení kvantity viru HCV je důležité při zahájení léčby a hlavně sledování účinnosti léčby (20).

Nejčastěji vyšetřujeme krevní sérum nebo plazmu, HCV virus lze diagnostikovat přímo nebo nepřímo. Průkaz anti-HCV protilátek (nepřímý průkaz) metodou Elisa se rutinně provádí ve většině laboratoří a je to základní screening. Detekovatelné anti-HCV protilátky vznikají tři týdny až tři měsíce po primoinfekci (u každého jednotlivce je protilátková odpověď různá), test bývá v časných fázích infekce negativní (21).

K průkazu viru se používají mimo jiných i molekulárně biologické metody PCR – polymerázová řetězová reakce. Pro detekci pomocí PCR je v první fázi třeba vyizolovat virovou RNA (ribonukleovou kyselinu) z biologického materiálu. Viry RNA lze izolovat izolačními přístroji (tzv. izolátory) nebo manuálně s pomocí izolačních kitů (1).

Výsledkem může být různý stupeň výtěžnosti a čistoty RNA. Ve své práci jsem používala pouze ruční kolonkovou izolaci. Po získání virové RNA následuje kvalitativní průkaz. Byla použita in house metoda - pomocí RT PCR (PCR s reverzní transkripcí) a následnou PCR se amplifikují specifické úseky virové RNA, které jsou vizualizované gelovou elektroforézou, s použitím ethidium bromidu. Používá se dvoukroková PCR. V prvním kole reakce probíhá reverzní transkripce 30 minut při 50°C, za přítomnosti RNase inhibitoru a enzymu reverzní transkriptázy dojde k přepisu RNA na cDNA, následně k namnožení úseku se specifickými primery. Toto vše je součástí jedné PCR reakce, která probíhá v přístroji tzv. termocycler za přítomnosti specifických primerů, vody, pufru, nukleotidů a specifického enzymu. Pro druhé kolo PCR Nested

(zahnížděná PCR) se používají další dvě jiné specifické sekvence primerů, tato PCR se používá pro zvýšení citlivosti a specificity metody. Produkty PCR jsou vizualizované na agarózovém gelu s použitím interkalačního činidla (nejčastěji ethidium bromid) **(3)**.

Kvantitativní průkaz pro zjištění hladiny virémie se provádí pomocí real time PCR. Detekce probíhá v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se specificky vážou na PCR amplifikát. Detekce intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje průkaz a kvantifikaci produktů. Zároveň je systém schopen identifikovat potenciální PCR inhibici přítomností interní kontroly. Pro kvantifikaci se dodávají externí pozitivní kontroly, s jejichž pomocí lze určit množství viru ve vzorku. Po přidání standard o známé koncentraci do reakce vznikne kalibrační křivka, podle níž lze kvantifikovat vyšetřované vzorky **(19)**.

Ve své práci jsem porovnávala 2 izolační soupravy:

a) High Pure Viral RNA Kit (Roche) - kit určený k izolaci RNA viru z biologického materiálu (sérum, plazma). V první fázi dochází k lýze biologického materiálu, uchycení RNA na kolonce s membránou, několikanásobné promytí a poté k eluci RNA do vody – k použití pro real time – PCR **(8)**.

b) QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) – kit je určený k izolaci virové RNA z lidské plazmy nebo séra. Nejprve dochází k lýze biologického materiálu, uchycení RNA na kolonce s membránou, promytí a eluci RNA do vody - k použití pro real time – PCR **(13)**.

Pro zjištění rozdílů v izolaci byly použity vzorky, které byly kvantifikovány pomocí real time PCR. Prokázal se rozdíl ve výtěžcích RNA mezi výše uvedenými soupravami. Vzorky izolované soupravou QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen) vykazovaly po kvantifikaci vyšší hodnoty naměřené virové RNA.

Summary

Hepatitis C is a virus caused liver irritation, which leads to hepatocellular carcinoma in more than a quarter of cases. Six different genotypes with at least fifty different subtypes are known (3). Hepatitis C virus rapidly undergoes mutation, which causes every infected person to have more of slightly different variants of the virus in their body. Consequently, the immune system often loses control over the virus, which can lead to the observed chronicity. Qualitative confirmation is important for determination of the presence of the virus. Quantitative confirmation, on the other hand, is crucial for commencing and monitoring of the treatment. (20)

The most often examined species is blood serum, or plasma. HCV can be diagnosed directly, or indirectly. Confirmation of the presence of anti-HCV antibodies (indirectly) by Elisa method is routine and very basic screening in most laboratories. Detectable anti-HCV antibodies occur three weeks to six months after the primoinfection (every person's immune system reacts differently). This indirect test is usually negative in early phases of infection. (21)

For direct confirmation of the virus, solely PCR – polymerase chain reaction – methods are used. In the first phase, it is necessary to isolate RNA of the virus from the biological material. This can be done either by a special isolation instrument, or manually, using special isolating kits.

Use of different methods may result in different yield and purity of RNA. In my work, I used only hand column isolation. After obtaining the RNA of the virus, qualitative confirmation follows. In my case, an “In house” method was used –the RT PCR (reverse transcription PCR) followed by the PCR amplification of specific segment of viral RNA, which are visualized by gel electrophoresis in presence of ethidium bromide, which works as an intercalation species. Double step PCR is used. In the first step, reverse transcription progresses for 30 minutes at 50°C. In the presence of RNase inhibitor and reverse transcriptase enzyme RNA is overwritten to cDNA, which is subsequently multiplied using specific primers. This process is a part of one PCR reaction, which takes place in the Thermocycler in the presence of specific primers, water, buffer, nucleotides, and specific enzyme. For the second round of Nested PCR

two different sequences of primers are used. PCR is used for enhancing the sensitivity and specificity of the method. Products of the PCR are then visualized on the agarose gel with intercalation agent (most commonly ethidium bromide).(3)

Quantitative determination of viremia level is carried out with Real Time PCR. Detection proceeds in real time using fluorescence dyes. Dyes are usually bonded onto oligonucleotide probe, which specifically bonds to a PCR amplificate. Measuring the intensity of fluorescence enables confirmation and quantification of the products. The system is also able to identify potential PCR inhibition with internal control. After addition of standards of known concentration, we can work out a calibration curve and use it to quantify measured samples (19).

In this work, two isolation kits are compared:

- a) High Pure Viral RNA Kit (Roche) – kit used for isolation viral RNA from biological material (serum, plasma). In the first phase, biological material is decomposed, RNA is collected on the column with membrane, washed multiple times and eluted to water for use in Real Time PCR (8)
- b) QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) – kit used for isolation of viral RNA from blood plasma, or serum. Firstly, biological material is decomposed, RNA is collected on the column with membrane, washed multiple times and eluted to water for use in Real Time PCR (13).

To determine the differences in isolation, I used samples which were quantified by Real Time PCR. It has shown a difference in the RNA yields for the two kits mentioned above. The samples isolated with the QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen) have shown higher values of measured viral RNA after quantification.

Obsah

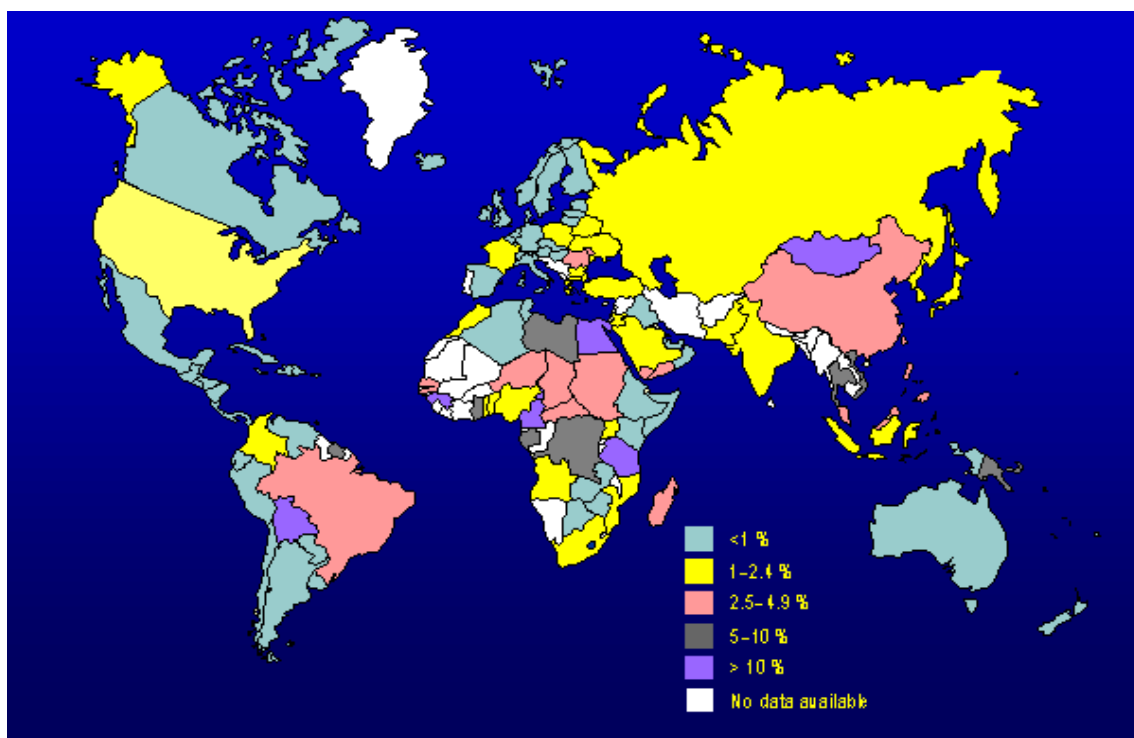
Úvod.....	10
1. Současný stav.....	12
2. Cíle práce a hypotézy	13
3. Metodika	14
3.1 Laboratorní vyšetřovací metody HCV.....	14
3.1.1 Detekce protilátek	14
3.1.2 Průkaz viru.....	14
3.2 Struktura a vybavení laboratoře	15
3.2.1 Laboratoř pro izolaci.....	16
3.2.2 Laboratoř pro přípravu reakčních směsí – mastermix.....	18
3.2.3 Laboratoř pro amplifikaci – PCR.....	18
3.2.4 Laboratoř pro elektroforézu ELFO.....	19
3.3 Metody izolace RNA HCV použité v bakalářské práci.....	19
3.3.1 Izolace RNA – High Pure Viral RNA kit (firma ROCHE)	20
3.3.2 Izolace RNA – QIAamp Viral RNA mini kit (firma QIAGEN)	21
3.4 Kvalitativní průkaz	22
3.4.1 Reverzní transkripce	22
3.4.2 Princip PCR	22
3.4.3 Příprava master mixu (reagenční směsi) pro kvalitativní průkaz HCV.....	24
3.4.4 První PCR HCV	24
3.4.5 Druhá PCR HCV.....	26
3.4.6 ELFO detekce.....	27
3.5 Kvantitativní stanovení RNA HCV.....	28
3.5.1 Příprava reakční směsi.....	29
3.5.2 Detekce a vyhodnocení.....	30
4. Výsledky.....	31
4.1 Kvalitativní hodnocení.....	31
4.2 Kvantitativní hodnocení.....	33
4.3 Kvantitativní hodnocení izolačních souprav	37
5. Diskuse	38
6. Závěr.....	40

7. Seznam použité literatury	41
Klíčová slova	44

Úvod

Téma mé bakalářské práce – Diagnostika viru hepatitidy C s použitím metod molekulární biologie.

Hepatitida C je onemocnění virového původu. Virus byl objeven teprve nedávno (r. 1989), do té doby byla známa pouze hepatitida typu A a typu B. Hepatitida C je v současnosti infekce světového významu, odhaduje se, že počet infikovaných je čtyřikrát vyšší než počet osob nakažených virem HIV a dosahuje více než 3% světové populace (obr. č. 1). V absolutních číslech je to více než 180 miliónů nemocných ve světě, přičemž asi 4 miliony žijí v USA, 5 milionů v západní Evropě a 2 miliony v Japonsku. Infekce je nejčastější v Africe, Jižní Americe a jihovýchodní Asii, kde je pravděpodobně infikováno 10-20% populace, místy i více. V Evropě je nejvyšší výskyt onemocnění ve Středozeří (v průměru 1-3%, lokálně však mnohem vyšší, například na Sicílii více než 10%).

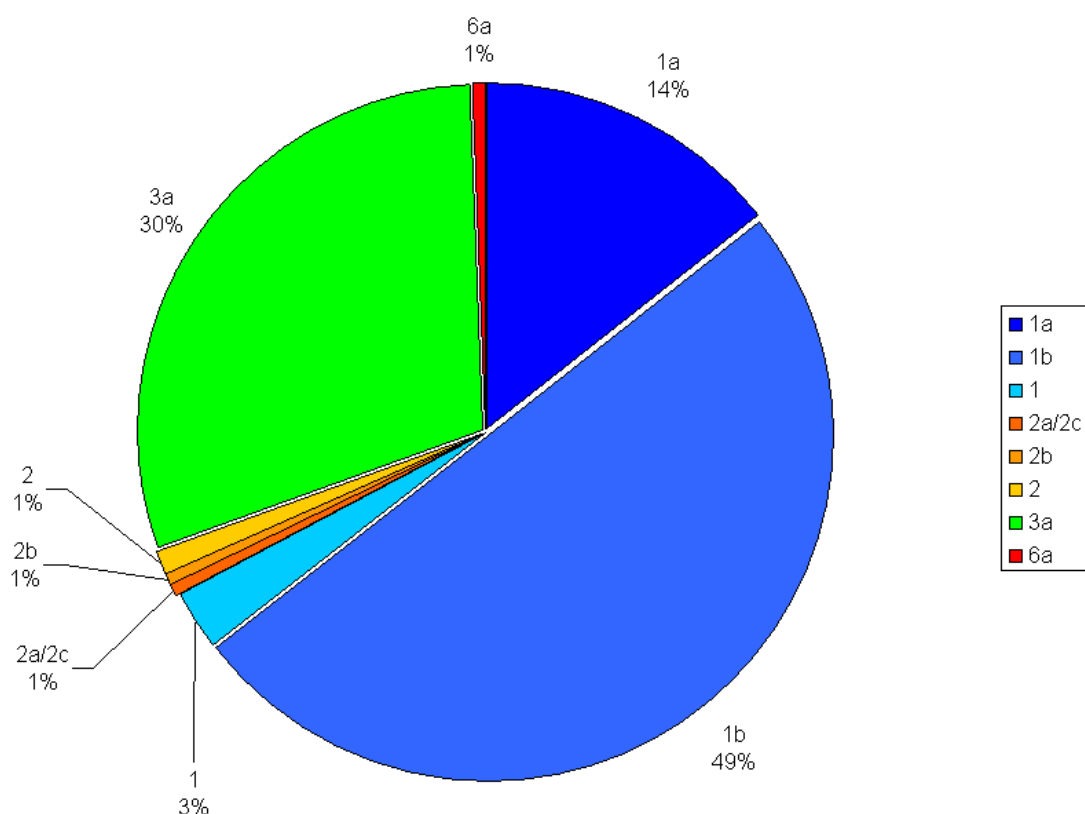


Obr. č. 1: Výskyt hepatitidy C v celosvětovém měřítku.

Chronická hepatitida C problémem nejen rozvojových, ale i rozvinutých zemí světa (22). Virus hepatitidy C vyvolává akutní nebo chronickou hepatitidu C začínající zánětem jater. Akutní onemocnění může být provázeno těmito nepříliš jednoznačnými příznaky: únava, přechodná ztráta chuti k jídlu, poruchy spánku, svědění kůže anebo její žlutavé zabarvení, pocit napětí v pravém podžebří nebo trávicí obtíže. Toto vše probíhá relativně pomalu a nepozorovaně, organizmus svými obrannými mechanismy dlouho dokáže kompenzovat jakékoliv příznaky. Ve většině případů se přítomnost tohoto viru v těle zjistí buď náhodně při vyšetřování jiných potíží, nebo v chronickém stádiu, kdy jsou již játra velmi poškozena (11). Při dlouhodobém zánětu dochází ke zjizvení jaterní tkáně, takzvané fibróze – jaterní buňky jsou nahrazovány vazivem, ztrácejí svoji funkci, játra přestávají fungovat. Po dlouhodobé chronické infekci může hepatitida typu C skončit jaterní cirhózou nebo rakovinou jater. Poslední fáze je v současnosti nejčastějším důvodem k transplantaci jater. (7) Před rokem 1992, kdy bylo zavedeno rutinní testování dárců krve, se většina osob infikovala transfuzemi krve či krevních derivátů. To platí především pro hemofiliky (pacienty s vrozenou poruchou krevní srážlivosti) a pacienty na hemodialýzách (umělých ledvinách). Ve vyspělých státech světa ztratila tato cesta přenosu infekce v současnosti na významu. Nejohroženější skupinou jsou jednoznačně injekční uživatelé drog, půjčují si navzájem injekční stříkačky a jehly. Rizikové aktivity představují i tetování a piercing, pokud nejsou prováděny v náležitých hygienických podmínkách. (23) Možný je i přenos infekce sexuálním stykem. Nebezpečí přenosu infekce HCV sexuální cestou z infikovaného muže na ženu je asi třikrát vyšší, než naopak. V řadě případů je rozhodnutí o nejpravděpodobnějším způsobu přenosu infekce HCV velmi obtížné. Jedná se zejména o mladé lidi, kteří mají v anamnéze závislost na drogách a zároveň jsou i sexuálními partnery. Přenos infekce virem hepatitidy C z matky na dítě je velmi vzácný a pravděpodobnost infikování dítěte během porodu se udává mezi 2-6%. I při nejpečlivějším zkoumání zůstává u významné části infikovaných cesta přenosu infekce HCV neznámá. Podle velkých zahraničních statistik je to v 10-30% případů. Jde především o starší pacienty, kteří se infikovali před několika desítkami let a infekce HCV byla u nich diagnostikována teprve v poslední době (22).

1. Současný stav

Virus hepatitidy C, je obalený RNA virus, čeledi Flaviviridae. Genom HCV obsahuje jediný gen kódující polyprotein, jenž je podroben štěpení na jednotlivé strukturální a nestrukturální proteiny. Srovnání sekvence nukleotidů v různých izolátech ukázalo na neobvyklou heterogenitu HCV. Oblast genomu, kódující E2 protein obsahuje hypervariabilní oblasti, které pod tlakem protilátek intenzivně mutují. Každý virový izolát je komplexem genetických variant, mezi nimiž existují drobné rozdíly v sekvenci nukleotidů.**(30)** Do dnešního dne bylo popsáno šest hlavních genotypů viru hepatitidy C označovaných jako genotypy 1 - 6. Byla popsána řada subtypů (1a-1c, 2a-2d, 3a-3f, 4a-4k, 5a a 6a) a nové jsou dále průběžně objevovány. V České republice jednoznačně převládá infekce genotypem 1, druhým nejčastějším je genotyp 3. Ovšem v důsledku migrace obyvatel se stále častěji objevují i jiné genotypy, např. genotyp 2 v důsledku imigrace zejména z Ukrajiny. Z řady studií vyplynulo, že HCV genotyp ovlivňuje reakci na léčbu jak při monoterapii (samotný interferon alfa), tak při terapii kombinované (interferon alfa s ribavirinem). Obecně se infekce genotypem 1 léčí obtížněji (některé studie ukazují, že odpověď pacientů s genotypem 4 je podobná) než infekce genotypem 2 nebo 3. Mimoto HCV genotyp 1 postihuje závažněji játra než ostatní. Z tohoto důvodu je třeba při hodnocení chronicky infikovaných pacientů brát v úvahu i příslušný genotyp HCV.**(11,12)**



Obr. č. 2: Zastoupení jednotlivých genotypů hepatitidy C

Na obrázku č. 2 vidíme poměr zastoupení jednotlivých genotypů z celkového počtu hepatitidy typu C.

2. Cíle práce a hypotézy

Cílem mojí práce bylo osvojit si kvalitativní a kvantitativní stanovení viru hepatitidy C. Vybrala jsem soubor pozitivních vzorků, RNA byla vyizolována dvěma různými izolačními soupravami a vyšetřena kvantita. Domnívám se, že kvantita vzorků zpracovaných oběma izolačními soupravami je shodná.

3. Metodika

3.1 Laboratorní vyšetřovací metody HCV

Laboratorní diagnostika je u pacientů s hepatitidou typu C velmi důležitá.

3.1.1 Detekce protilátek

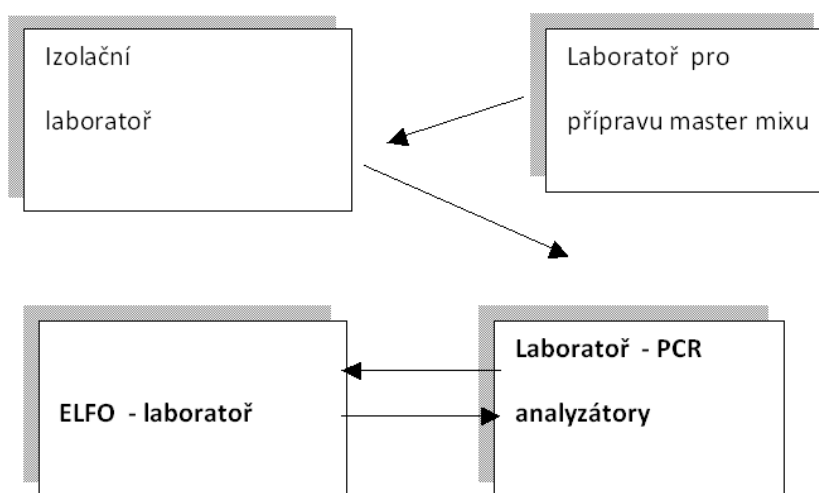
Mezi standardní metody průkazu viru patří sérologické detekční metody – detekce anti-HCV protilátek. Protilátky jsou markerem expozice – kontaktu dané osoby s virem hepatitidy C. Protilátky nemají neutralizační efekt, přetrvávají ve značném titru i u pacientů úspěšně vyléčených. Nejnovější sérologické metody mají senzitivitu 97% a specifitu až 99%. Vyšetření anti-HCV je vyšetření skринingové u všech osob, u kterých je podezření, že byly někdy v průběhu života virem exponovány. V případě negativního nálezu protilátek nelze jednoznačně říci, že pacient není nakažen (diagnostické okno), pokud chceme zůstat u jednoduchého a levného sérologického vyšetření, je třeba jej zopakovat s časovým odstupem (6). Nejnovější sérologické metody detekují protilátky anti-HCV i antigen, díky této diagnostice se zkrátilo diagnostické okno, ale o charakteru závažnosti onemocnění hepatitidou typu C toho moc nevyovídají (22).

3.1.2 Průkaz viru

K metodám přímého průkazu by patřila kultivace viru na tkáňových kulturách, která v případě viru HCV není možná. Molekulárně biologické metody jsou metody přímého průkazu viru. Jedna z metod je polymerázová řetězová reakce (PCR). Polymerázová řetězová reakce prokazuje přítomnost virové nukleové kyseliny (HCV RNA) v séru či tkáních infikovaného jedince. Všechny používané metody jsou dnes dostupné ve variantě kvalitativní i kvantitativní. Vzhledem k poslednímu vývoji terapeutických možností a z toho vyplývajících požadavků na molekulárně genetická vyšetření, většina pracovišť rutinně provádí kvantitativní hodnocení. Z dostupných metod největšího rozšíření našla metoda amplifikace nukleové kyseliny v reálném čase – real time PCR. Molekulárně genetické metody umožňují určit i genotyp viru HCV. (29) Genotyp viru je nutné určit při prvotním zjištění infekce virem hepatitidy C. Pro lékaře je to důležitá informace při zahájení léčby, různé genotypy odpovídají na léčbu různě.(12)

3.2 Struktura a vybavení laboratoře

Pro PCR diagnostiku je nutné funkční členění pracoviště (minimálně 3, lepší 4 místnosti) – viz. Obr. č. 3, aby se zabránilo kontaminaci vzorků a tím se předešlo falešně pozitivním výsledkům. Vzorky do laboratoře jsou přijímány v laboratoři pro izolaci a zde je vyizolována RNA. Je nutné všemi možnými způsoby zabránit kontaminaci. Po izolaci následuje příprava příslušného reakční směsi (mastermix) v laboratoři pro její přípravu, do připravené směsi, se přidá pouze negativní kontrola (5 µl vody) a přenese se chlazený stojánek s reakční směsí do izolační laboratoře. Zde se přidá vyizolovaná RNA, pozitivní kontrola a přenese se do laboratoře s PCR analyzátory, kde proběhne PCR reakce v cycleru. Poté následuje příprava příslušného mastermixu pro Nested PCR a v laboratoři s analyzátory, se přepipetuje 5µl do další připravené PCR reakce a pustí se cycler s příslušným programem. Po doběhnutí reakce se přenese do ELFO - laboratoře a pustí se elektroforéza. Po odečtu PCR se likvidují amplikony (produkty PCR) dle předpisů.



Obr. č. 3: Pohyb materiálu, abychom zabránili kontaminaci.

3.2.1 Laboratoř pro izolaci

Tato laboratoř je zároveň i laboratoř příjmová, jsou zde přijímány nové vzorky, zapisovány žádanky do počítače a vzorky zpracovávány příslušným způsobem, ukládány do lednice nebo do mrazáku. V izolační laboratoři jsou prováděny izolace RNA.

Vybavení laboratoře pro izolaci:

- Laminární box – s vertikálním prouděním vzduchu. Je vybaven dvěma HEPA filtry, které odstraňují částice větší než 0,3 μ m s účinností 99,99%. Jeho součástí je ovladač vnitřního osvětlení nebo UV světla. Uspořádání boxu chrání hlavně materiál zpracováváný v boxu, ale i pracovníka a vnější prostředí.(zabránění kontaminacím)
- Dry Block – termostat s širokým teplotním rozsahem. Požadovanou teplotu lze snadno nastavit pomocí šipek a hodnoty se zobrazují na digitálním displeji. Uvnitř bloku dochází k rovnoměrnému rozložení teploty tak, že všechny vzorky jsou vystaveny stejné teplotě nezávisle na jejich umístění.
- Centrifuga – stolní odstředivka s rotorem pro stáčení zkumavek, je určena pro práci se zkumavkami s odebraným materiálem (krev).
- Centrifuga – stolní odstředivka s aktivním chlazením a nastavitelnou rychlostí otáček (až 25 000 g). Je určena pro práci s mikrozkuškami.
- Vortex – umožňuje protřepání a promíchání vzorku.
- Rukavice – bez thalku (pudru). Thalek by mohl inhibovat nebo ovlivňovat PCR reakci. Vnitřní vrstva je ze syntetického materiálu, jehož složení snižuje riziko vzniku alergické reakce.

- Mikrozkušavky - uzavíratelné, vyrobené z polypropylenu odolného vůči vysokým teplotám i chemickým látkám. Díky tepelné odolnosti se provádí jejich resterilizace v autoklávu (121°C, 21 minut).
- Pipeta – Pasteurova (plastová)
- Mikropipety – Finnpiquette Digital (objemy: 0,5-5 μ l, 1-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l) - autoklávodatelné pipety s nastavitelným objemem pracující na principu nasávání a vytlačování vzduchu. Při práci se používají odnímatelné špičky, sterilní s filtrem. Jsou vyrobeny z čirého polypropylenu bez příměsí.
- Sterilní špičky s filtrem k mikropipetám
- Lednice, mrazák, teploměry k lednici a k mrazáku.
- Stojánky na zkumavky a mikrozkušavky
- Kit na izolaci RNA ze vzorku.

3.2.2 Laboratoř pro přípravu reakčních směsí – mastermix

Tato laboratoř je ze všech místností nejčistější. V laboratoři se připravují pouze reakční směsi - master mixy.

Vybavení laboratoře pro přípravu mastermixu

- PCR box
- Mikrocentrifuga
- Vortex
- Mrazák, lednice
- Chladicí stojánky, PCR mikrozkušavky 0,2ml, nastavitelné mikropipety, sterilní špičky s filtrem, rukavice bez thalku (pudru)

3.2.3 Laboratoř pro amplifikaci – PCR

V této místnosti jsou umístěny přístroje thermocyclery, LightCycler a Rotor Gene Q

Vybavení laboratoře pro amplifikaci:

- Thermocycler – přístroj zahřívá a chladí mikrozkušavky s PCR směsí podle předem daného programu.
- Rotor Gene Q firma QIAGEN cycler pro RT-PCR, kvantitativní a kvalitativní detekce nukleových kyselin pomocí polymerázové řetězové reakce ve zkumavkovém systému
- Počítač se softwarem pro přístroj Rotor Gene Q
- LightCycler firma Roche – cycler pro RT-PCR, kvalitativní a kvantitativní detekce nukleových kyselin pomocí polymerázové řetězové reakce v kapilárním systému.
- Počítač se softwarem pro přístroj LightCycler.

3.2.4 Laboratoř pro elektroforézu ELFO

Místnost, ve které se provádí odečet vzorků PCR pomocí elektroforézy.

Vybavení laboratoře pro ELFO:

- Zdroj napětí – Biometra -jednosměrný el.proud 120 V
- ELFO vana – SCIE – PLAS
- Digestoř
- Transiluminátor – Biometra
- Přístroj pro vyhodnocení – MiniBis
- Mikrovlnná trouba

3.3 Metody izolace RNA HCV použité v bakalářské práci.

Vzorek krve je odebrán pacientovi a v co možné nejkratší době doručen do laboratoře. Poté hned centrifugován 10 minut při 2500 x g (dochází k degradaci RNA ovlivňující kvantitu). Sérum je staženo do 1,5ml mikrozkuvek označených jménem pacienta a identifikačním číslem, a uloženo do mrazícího boxu, pokud ke zpracování nedojde okamžitě.

3.3.1 Izolace RNA – High Pure Viral RNA kit (firma ROCHE)

Obsah reagensií v kitu:

- Poly A carrier RNA
- Binding buffer
- Removal buffer
- Washing buffer
- Elutions buffer
- kolonky, sběrné nádoby

Pracovní postup izolace

Připraví se pracovní roztok dle přiložené tabulky – na jeden vzorek: 500 μ l Binding buffer + 4 μ l Poly A carrier RNA tato směs se připraví pro příslušný počet vzorků násobkem obou reagensií. Pracovní pufr se připraví vždy čerstvý ve sterilní nádobě (RNAáza free zkumavka nebo sterilní penicilinka) opatrně se promíchají pouze posunem po stole (je velmi viskózní, pozor na bublinky). Vzorky séra, které se uchovávají v mrazáku, se nechají rozmraznout a poté zvertexují (promíchají) a jsou připravené k izolaci. Do RNAáza free zkumavek se napipetuje 400 μ l pracovního pufru a přidá se 200 μ l vzorku a důkladně se zvertexuje alespoň 30 sekund. Tato směs se přelije do kolonky a centrifuguje se 8000 x g na 1 minutu. Přendá se do čistých sběrných zkumavek a přidá se 500 μ l Inhibitor Removal buffer (součást kitu). Centrifuguje se 8000 x g na 1 minutu. Přendá se do čistých sběrných zkumavek a přidá se 450 μ l Washing buffer (součástí kitu - promývací roztok). Centrifuguje se 13000 x g na 3 minuty (osušení membrány v kolonce) a přendá se do čistých RNA mikrozukumavek (eppendorfek 1,5 ml) a přidá se 50 μ l Elution buffer (součást kitu - voda). Centrifuguje se 8000 x g za minutu a v mikrozukumavce je vyizolovaná RNA k použití do PCR reakce. Takto vyizolovanou RNA lze uchovávat v lednici pouze krátkodobě (max. hodina), dlouhodobější skladování pouze v mrazáku (i při chladničkové teplotě RNA rychle degraduje). Takto vyizolovaný vzorek se použije pro kvalitativní i pro kvantitativní vyšetření.

3.3.2 Izolace RNA – QIAamp Viral RNA mini kit (firma QIAGEN)

Obsah reagensií v kitu

- Vol. Buffer AVL
- Vol. Carrier RNA-AVE
- AW 1 - koncentrovaný (při použití do reakce musíme naředit absolutním alkoholem dle návodu)
- AW 2 - koncentrovaný (při použití do reakce musíme naředit absolutním alkoholem dle návodu)
- Elutions buffer
- Kolonky, sběrné nádoby

Pracovní postup izolace

Připraví se pracovní roztok dle přiložené tabulky – na jeden vzorek: 0,56 Vol. buffer AVL (ml) + 5,6 Vol. carrier RNA-AVE (μl) tato směs se připraví pro příslušný počet vzorků násobkem obou reagensií. Vzorky séra, které se uchovávají v mrazáku, nechají se rozmraznout, poté se zvortexují a vzorky jsou připraveny k izolaci. V 1,5ml mikrozkuhavce (eppendorfka) je smícháno 560 μl směsi pracovního roztoku a 140 μl vzorku a důkladně zvortexováno minimálně 30 sekund a inkubuje se při pokojové teplotě 10 minut. Poté je ke vzorku s pracovním pufrem přidáno 560 μl 99,5% etanolu. Důkladně se zvortexuje a krátce centrifuguje (impuls). Na předem připravenou kolonku je přeneseno mikropipetou 630μl lyzátu a zcentrifugováno při 6000 x g za 1minutu. Kolonka se přendá do čisté sběrné zkumavky a přidá se zbytek lyzátu. Znovu se centrifuguje 6000 x g za 1minutu. Kolonka se opět přendá do čisté sběrné zkumavky a přidá se 500 μl AW1 (promývací roztok č. 1- součástí kitu). Centrifuguje se při 6000 x g na 1 minutu a kolonka se přendá do čisté sběrné zkumavky. Na kolonku se nanese 500 μl AW2 (promývací roztok č. 2 - součástí kitu) a znovu se centrifuguje při 13000 x g na 3minuty – dokonalé vysušení kolonky. Všechny roztoky do této fáze jsou alkoholové roztoky, využívá se faktu, že nukleové kyseliny (RNA i DNA) jsou v alkoholu nerozpustné a jsou zachyceny na membráně kolonky. Osušená kolonka se

přendá do 1,5ml mikrozkušavky a přidá se 60 μ l elučního pufru AVE (absolutně čistá voda, v ní je RNA rozpustná a sestoupí z membrány kolonky do mikrozkušavky) poté se centrifuguje 6000 x g na 1minutu. Takto vyizolovaná RNA se použije do PCR reakce, nebo lze uchovávat v lednici, ale pouze krátkodobě (max. hodina), dlouhodobější skladování je možné pouze v mrazáku (při pokojové teplotě RNA rychle degraduje).

3.4 Kvalitativní průkaz

3.4.1 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém pomocí enzymu reverzní transkriptázy dojde k vytvoření komplementární DNA (cDNA) a následně může být syntetizovaná cDNA amplifikována pomocí tradiční PCR. Vyizolovanou RNA ze vzorku je nutné pomocí reverzní transkriptázy (enzym) převést na komplementární cDNA, tento krok není zvlášť obtížný, ale metoda je technicky náročná, protože RNA rychle degraduje účinkem ribonukleáz, které jsou obecnými kontaminaty vzorků. RNasy jsou termostabilní, aktivní jsou i po čištění materiálu denaturačními činidly, ničeny jsou pouze roztoky s inhibitory RNAs. Po takto upravené RNA může dojít ke klasické polymerázové reakci (PCR).(22)

3.4.2 Princip PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR - z anglického Polymerase Chain Reaction) je cyklická řízená reakce sloužící k amplifikaci (zmnožení) určitého úseku molekuly DNA a k replikaci (zdvojení) nukleových kyselin. Úseky DNA, které chceme namnožit, musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery. PCR je způsob jak vytvořit mnoho milionů kopií vzorového fragmentu DNA. Každá PCR reakce začíná počáteční denaturací (rozpletení DNA rozpadem vodíkových můstků) a tak vznikají vazebná místa pro primery. Počáteční denaturace se provádí při 95°C po dobu 2 až 5 minut.

U vzorků bohatých na G/C páry je doba prodloužena na 10 minut. Po ukončení počáteční denaturace následuje cyklus, který se skládá ze tří kroků:

1. Denaturace – mikrozkuhavka s reakční směsí v cycleru se zahřeje na teplotu 94 – 96 °C. Dochází k relaxaci a denaturaci (rozpojení rozpadem vodíkových můstků) molekuly dsDNA do dvou ss molekul, na tzv. templátové DNA.

2. Hybridizace (dosednutí primerů) – ochlazení reakční směsi na 50 – 65 °C umožňuje navázání primerů k jejich komplementárním sekvencím na ssDNA. Teplota určuje specifickou vazbu primeru na templát.

3. Elongace – zahřátí reakční směsi na 70 – 72 °C, následuje navázání DNA polymerasy (enzym) a prodloužení vlákna DNA od každého primeru až na konec templátové DNA pomocí volných dNTP (nukleotidů). Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus reakce. Tento cyklus se mnohokrát opakuje a během krátké doby, tak dochází k mnohonásobné amplifikaci sekvence DNA. Během každého cyklu dojde ke zdvojnásobení počtu těchto sekvencí, teoretický počet takto vzniklých sekvencí přibývá exponenciálně. Celkový počet skutečně vzniklých produktů je nižší než tento údaj v důsledku postupné degradace enzymu. PCR reakce končí závěrečnou extenzí. Vzorek je ponechán při 72°C po dobu 5 až 15 minut, aby mohlo dojít k dokončení syntézy a renaturaci jednovláknových produktů (5).

Nejčastěji se vyšetřuje sérum nebo plazma, HCV virus lze také stanovit ve tkáni jater. K průkazu HCV RNA se u nás používá „in house” metoda, ve které se pomocí RT-PCR (reversní transkripce polymerázové řetězové reakce) a následnou dvoukrokovou polymerázovou řetězovou reakcí (nested PCR) amplifikují specifické úseky virové RNA. Vzniklé PCR produkty jsou vizualizované gelovou elektroforézou.

3.4.3 Příprava master mixu (reagenční směsi) pro kvalitativní průkaz HCV.

Metoda Nested PCR

Princip – Nested PCR je variantou polymerázové řetězové reakce (PCR), při které se používají dva páry (místo jednoho páru) primerů k zesílení fragmentů PCR produktu. První dvojice PCR primerů se amplifikují, zmnoží fragment. Druhá dvojice primerů jsou tzv. vnořené primery (vnořené do prvního fragmentu), ty se váží uvnitř prvního fragmentu PCR produktu. Ve druhém kole PCR (nested) se zvyšuje množství PCR produktu tím, že jako vstupní templát se používá předamplifikovaný produkt z první PCR. Touto metodou se zvyšuje citlivost, použitím vnitřních primerů se zajišťuje větší specifita (29).

3.4.4 První PCR HCV

V prvním kole nested PCR dochází k reverzní transkripci a zároveň k amplifikaci. Reverzní transkripcie z vyizolované RNA za pomoci SuperScript III Platinum One-Step přepis z RNA na cDNA

Primery: HCV1 -R-1-21 ggC GAC ACT CCA CCA TAg ATC

HCV2 -R-304-324 ggT gCA Cgg TCT ACg AgA CCT (17)

Příprava reakčního mixu pro první PCR HCV

Tabulka č. 1: Schéma přípravy reakční směsi pro první PCR

Reagencie	1 vzorek (μl)
PCR voda	4,8
2xThermo Script Reaction mix	12,5
Primer HCV1 (10 pM/μl)	1
Primer HCV2 (10 pM/μl)	1
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0,2
Thermo Script Plus Platinum Taq Mix Enzyme	0,5

Směs (viz. Tabulka č. 1) je připravena na chlazeném stojánku a rozplněna do sterilních PCR mikrozkušavek 0,2 ml po 20μl. V této místnosti je přidáno do poslední mikrozkušavky v řadě 5μl vody jako negativní kontrola. Takto připravená a rozplněná směs je přenesena do laboratoře na izolaci a zde je přidáno 5μl vyizolované RNA vzorku a 5μl známé pozitivní RNA HCV jako pozitivní kontrolu, kvůli porovnání velikosti při odečítání po elektroforéze. Poté je stojánek přenesen do laboratoře pro amplifikaci, vložen do cycleru a spuštěn příslušný program pro PCR 1.

Program pro cycler:

50°C 30 minut

94°C 5 minut

94°C 15 sekund

55°C 30 sekund

72°C 30 sekund

72°C 5 minut

10°C do ukončení

} 40x

Po proběhlé první PCR reakci je připraven reakční mix pro druhou PCR, tzv. Nested PCR a přepipetováno 5μl vzorku do druhé reakční směsi, vložen do cycleru a spuštěn příslušný program.

3.4.5 Druhá PCR HCV

Primery: HCV3 -R-24-48 CCC TAT CAg gCA gTA CCA CAA
HCV4 -R-264-284 CTg TgA ggA ACT ACT gTC TTC (17)

Příprava reakčního směsi pro druhou PCR HCV

Tabulka č. 2: Příprava reakční směsi pro 2. PCR

Reagencie	1 vzorek (μl)
PCR voda	13
Biotoools 10x pufer with MgCl ₂	2,5
Biotoools dNTP's 2,5 mM	2
Primer HCV 3 (10 pM/ μl)	1
Primer HCV4 (10 pM/ μl)	1
Biotoools DNA polymerase 1U/μl	0,5

Program pro cycler:

94°C 1minuta
94°C 15 sekund }
55°C 30 sekund } 40x cyklus
72°C 30 sekund }
72°C 5 minut
10°C do ukončení

Produkty PCR jsou detekovány na 2% agarózovém gelu.

3.4.6 ELFO detekce

Detekce je založena na rozdělení PCR produktů dle velikosti v agarózovém gelu, který je umístěn v elektrickém poli. Vlastní vizualizace je založena na fluorescenci ethidium bromidu při osvětlení UV světlem. Ethidium bromid je molekula, která se interkaluje (vmezeřuje) do dvoušroubovicové DNA.

Příprava ELFO gelu - Agaróza – 100 mg do 50ml pufru. K odměření pufru je použit odměrný válec o obsahu 100 ml. Agaróza s 1x TBE puftrem, (Tris, Acid. Boricum, EDTA, Aq. Purif., pH=8,0) je smíchána v baňce (o objemu 100 ml), přikryta skleněným víčkem a dále rozvařena v mikrovlnné troubě tak, aby nebyla patrná žádná zrnka agarózy (stačí 1 – 1,5 min). Roztok je zchlazen, a v digestoři přidána kapka ethidium bromidu. (karcinogenní látka, proto se pracuje v boxu s ventilací.)

V dalším kroku je připravena ELFO vanička, a ještě před nalitím gelu je důkladně oblepena lepicí páskou. Do vaničky je zasunut ELFO hřeben, to proto, aby se vytvořily jamky pro nanesení vzorků. Poté je agarózový gel vlit do vaničky, nechá se ztuhnout, po zatuhnutí (cca 10 minut) je opatrně hřeben vytažen a vzniknou jamky, do kterých se nanáší vzorky. Vaničku je vložena do ELFO vany tak, aby jamky byly u záporného pólu, a zalita 1x TBE puftrem. Ke vzorkům je přidán nanášecí pufr (obsahuje bromfenolovou modř a glycerol), barvička slouží k vizualizaci (putuje el. polem stejně jako DNA), glycerol slouží k usazení vzorku na dně jamky. Glycerol má vyšší hustotu a udrží vzorek na dně jamky, dokud není puštěn elektrický stejnosměrný proud, zároveň nemá vliv na putování DNA v elektroforéze. Kromě vzorků je nanášena negativní a pozitivní kontrola, se kterou jsou ve výsledku jednotlivé vzorky porovnávány. Poté je ELFO vaničku přikryta a zapnut zdroj napětí (120 V). Po skončení ELFO (cca 30 minut), je gel z vaničky vyjmut, a vložen do snímacího systému MiniBis, který se skládá z UV transiluminátoru a kamery. Je zhotovena fotografie gelu, která se zobrazí na monitoru PC, vysokoškolský pracovník provede odečet. V tomto případě jsou hodnoceny pouze pozitivní a negativní vzorky. V případě nejasností je možno pustit na ELFO i l. PCR a výsledky porovnat. Velikost PCR produktu lze odečíst podle předem známé pozitivní kontroly, která je daná do reakce i do PCR reakčního mixu. Vypovídá i o dobře proběhlé PCR reakci. V případě, že reakce neproběhne standardně, známá pozitivní kontrola není pozitivní, je nutné reakci zopakovat. Naopak, když vyjde

pozitivní i negativní kontrola je bezpodmínečně nutné reakci zopakovat, zřejmě se do reakce dostala kontaminace, v tomto případě může vysokoškolský pracovník rozhodnout i o přeizolování RNA vzorku, nebo požádat o odebrání nového vzorku krve. Dříve, dokud nebyly vypracovány metodiky na kvantitativní vyšetření HCV RNA, pouštěly se do gelu obě PCR reakce a hodnotilo se tzv. semikvantitativně. To znamená, že pokud v 1. PCR není v gelu žádný PCR produkt anebo velmi slabý je virová nálož slabá, pokud je produkt silný jak v 1. PCR i ve 2. PCR je virová nálož velmi vysoká.

3.5 Kvantitativní stanovení RNA HCV

Real-time PCR princip - je systém založený na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během reakce (tzv. v reálném čase) pomocí fluorescenčních barviv nebo sond, které detekují množství PCR produktu již během reakce. Výhodou oproti tradiční PCR je možnost kvantifikace produktu. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi (23).

Z takto vyizolované RNA je stanovena HCV RNA kvantita pomocí soupravy Artus HCV RG RT – PCR kit (výrobce QIAGEN). Je to systém k přímému použití pro průkaz HCV RNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v přístroji Rotor – Gene Q. Hepatitida C virus RG Master A a B obsahují reagentie a enzymy pro reverzní transkripci a specifickou amplifikaci 240 pb dlouhého úseku genomu HCV a také pro bezprostřední detekci amplifikátu ve fluorescenčním kanálu Cycling Green přístroje Rotor-Gene Q. Kromě toho obsahuje artus HCV RG RT-PCR kit druhý heterologní amplifikační systém pro průkaz potenciální PCR inhibice. Tento systém je detekován jako interní kontrola (IC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Orange přístroje Rotor-Gene Q. Spolu s produktem se dodávají externí pozitivní kvantifikační standardy (RG QS 1 – 4) s jejichž pomocí lze určit množství HCV RNA ve vzorku.

3.5.1 Příprava reakční směsi

Reakční směs je připravena v laboratoři pro přípravu mastermixů v PCR boxu podle Tabulky č. 3

Tabulka č. 3: Příprava reakční směsi pro kvantitativní stanovení

Reagencie	1 vzorek (μl)
Hep.C Virus RG Master A	12
Hep.C Virus RG Master B	18
Hep.C Virus RG IC	2

Směs je připravena na chlazeném stojánku a rozpipetována do sterilních PCR mikrozkušavek 0,2ml s plochým víčkem po 30 μl. Ke každé analýze je připravena reakční směs pro daný počet vzorků, pro negativní kontrolu amplifikace a kvantitativní standard. Kalibrační křivka složená ze čtyř kvantitativních standardů se připravuje vždy pro každé nové balení kitu. Do negativní kontroly je přidáno v této laboratoři 20μl vody. Poté je stojánek přenesen s namíchaným mastermixem do laboratoře pro izolaci a přidáno 20μl vyizolované RNA vzorku a 20μl všech standard v případě, že je aktivován nový kit, v případě že je připravováno z kitu, který byl již aktivován, je použita jen jedna standarda. Vlastní amplifikace a detekce probíhá v místnosti PCR na přístroji Rotor-Gene Q.

Reakční schéma:

50°C 30 minut

90°C 15 minut

95°C 30 sekund

50°C 60 sekund

70°C 30 sekund

} 50x

3.5.2 Detekce a vyhodnocení

Přístroj Rotor-Gene Q pomocí Rotor-Gene Q software detekuje přítomnost virové RNA pomocí prahové hodnoty cyklu (Ct) pro HCV RNA a následně provádí kvantifikaci RNA na základě srovnání kvantifikačního standardu HCV RNA a importované kalibrační křivky pro dané balení soupravy. Odečet fluorescence po amplifikaci virové RNA je prováděn v kanále Green, v kanále Orange se amplifikuje a detekuje interní kontrola.

Závěrečné hodnocení analýzy vychází z Tabulky č. 4

Tabulka č. 4: Hodnocení s interní kontrolou

Výsledné hodnocení	Signál v kanálu Green	Signál v kanálu Orange
Pozitivní	+	+
Pozitivní	+	-
Negativní	-	+
nelze hodnotit	-	-

Z dat naměřených přístrojem se podle následujícího vzorce vypočítá reálná hodnota množství RNA HCV, která je vyjádřena v počtu mezinárodních jednotek vztažených na 1 ml vzorku.

Koeficient pro přepočet naměřené hodnoty na IU vztažené na mililitr původního klinického materiálu se získá podílem elučního objemu (v mikrolitrech) a objemu vzorku použitého pro izolaci (v mililitrech). Pro námi používanou soupravu je tento koeficient 429.

Výsledek (IU/ml) = naměřená hodnota (IU/ μ l) x 429.

V případě, že není možné vyšetření vyhodnotit, provádíme opakovanou analýzu vzorku z uloženého alikvotu, popřípadě je vyžádán nový odběr.

Interní kontrola kvality

Prováděná PCR reakce obsahuje interní kontrolu, která plní funkci kontroly inhibice. Interní kontrola prochází celým procesem reverzní transkripce a amplifikace, zabraňuje vydání falešně negativního výsledku.

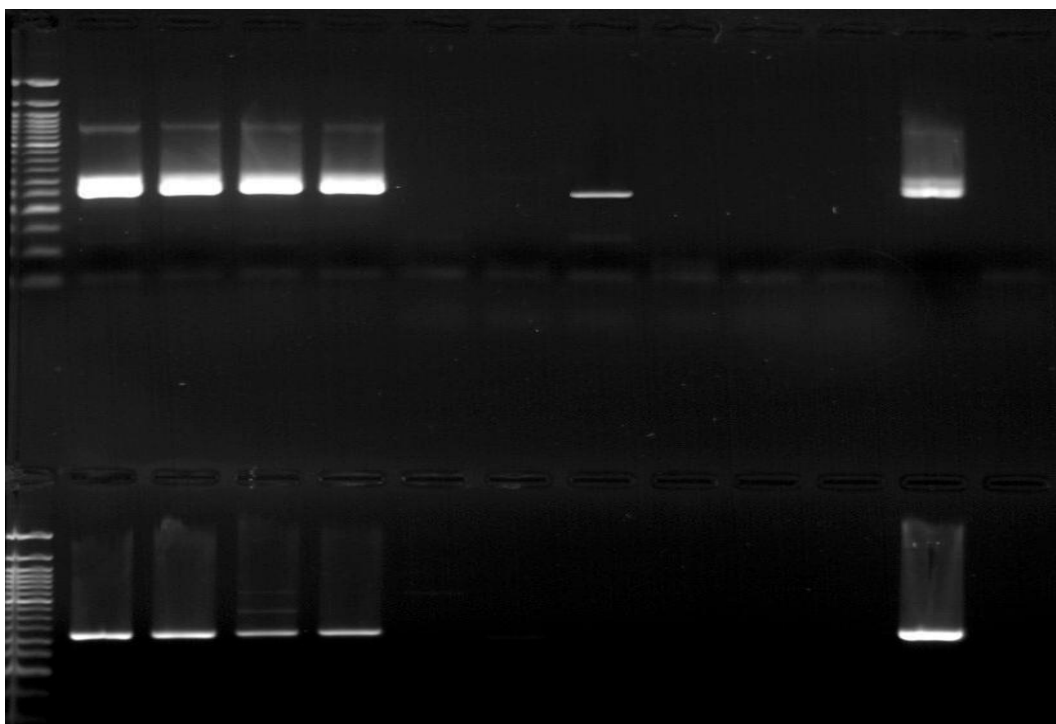
Je provedena analýza, odečet výsledků a vypočítána reálná hodnota kvantity HCV RNA.

4. Výsledky

Pro porovnání dvou izolačních souprav bylo nejprve nutné dokonale si osvojit jednotlivé metody.

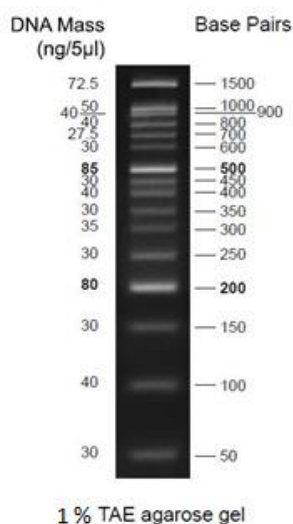
4.1 Kvalitativní hodnocení

Na obrázku (Obr. č. 4) je vidět výsledek kvalitativního průkazu – detekce na agarózovém gelu.



Obr. č. 4: Elektroforetický gel

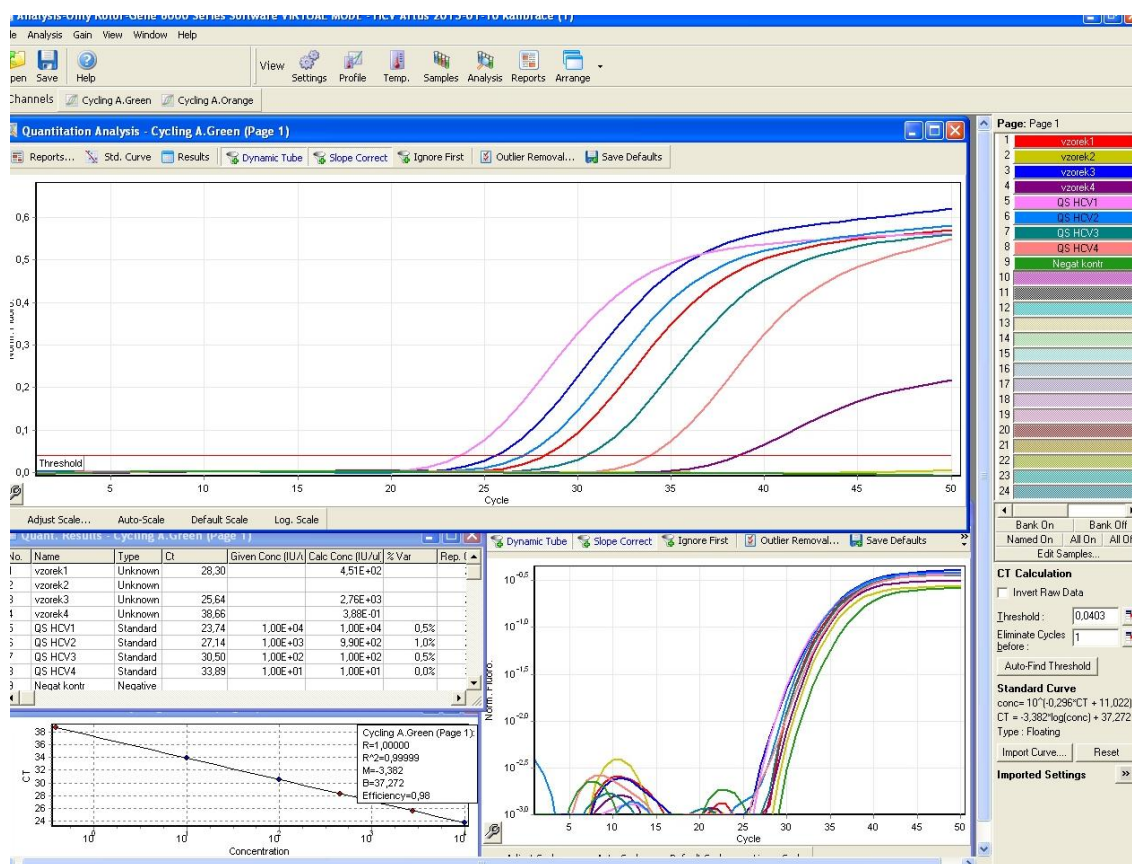
V dolní řadě jamek jsou vidět PCR produkty po prvním kole amplifikace a v horní jsou vidět PCR produkty z druhého kola (nested). V první jamce vlevo je velikostní standard (ladder). Jednotlivé fragmenty a jejich velikosti jsou vidět na obr. č. 5 podle něj je možné stanovit velikost fragmentů na gelu. Toto je důležitý údaj pro kontrolu specifity. V našem případě se jednalo o velikosti 325 párů bází (pb) pro PCR1 a 261 pb pro PCR2. V dalších čtyřech jamkách jsou pozitivní vzorky a v jamce číslo 7 je velmi slabě pozitivní vzorek, kde je PCR produkt přítomen až v PCR2. Zároveň je z obrázku patrné, že po druhém kole PCR je značně znásobeno množství produktu. Na konci ELFO gelu je pozitivní a negativní kontrola. Kvalitativní vyšetření vypovídá pouze o přítomnosti či nepřítomnosti virové RNA a hodnotit se může pouze semikvantitativně (silnější a slabší pozitivita).



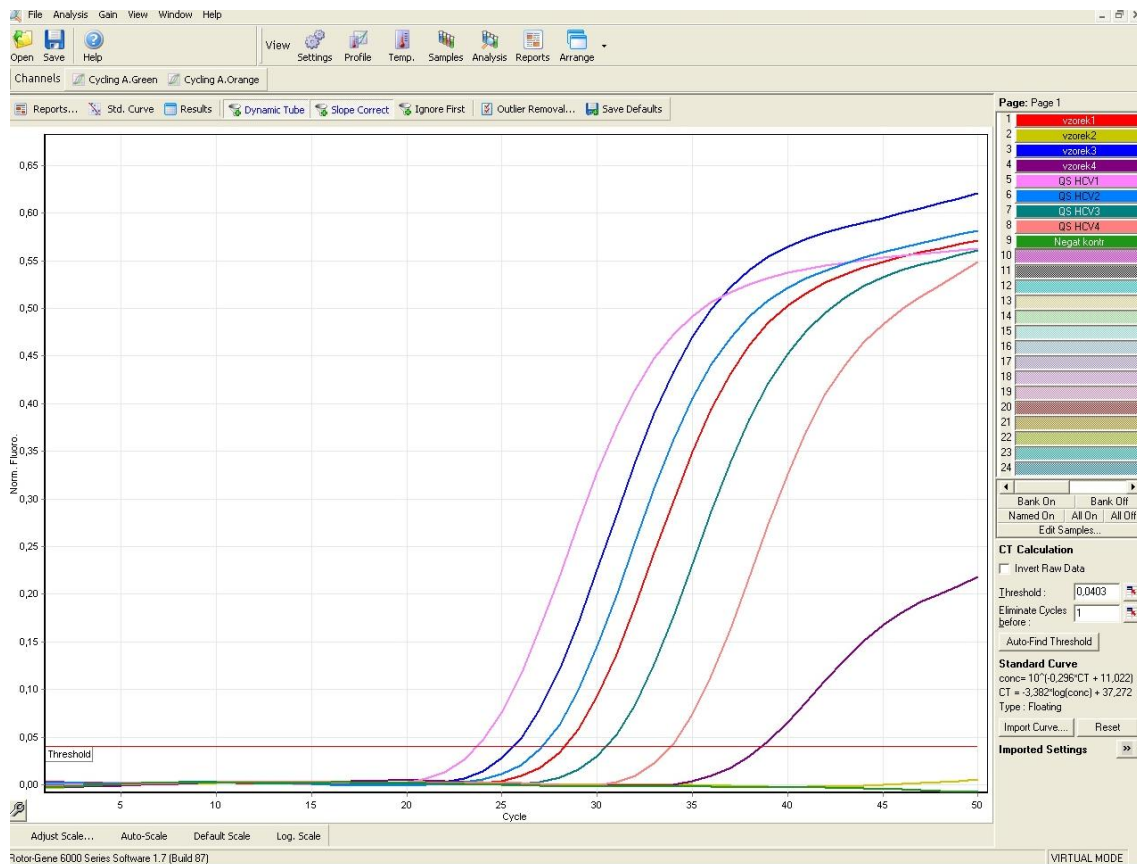
Obr. č. 5: Velikostní marker - ladder

4.2 Kvantitativní hodnocení

Po provedení kvalitativního průkazu jsou vzorky kvantifikovány pomocí soupravy HCV RG RT – PCR na přístroji Rotor – Gene Q. Výsledná analýza fluorescenčních křivek je znázorněna na Obr. č. 6.

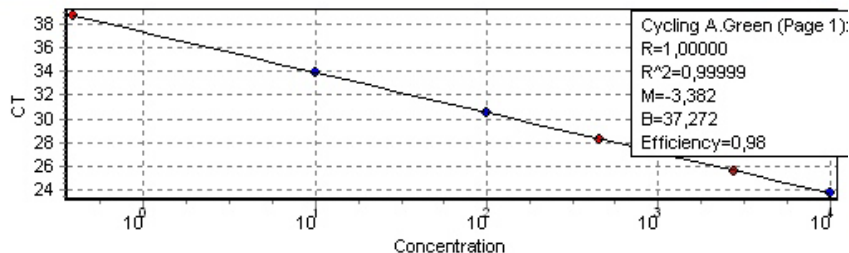


Obr. č. 6: Ukázka výsledných parametrů po provedení analýzy dat.



Obr. č . 7: Amplifikační křivky pro kanál green - detekce HCV RNA

Na obrázku č. 7 - jsou vidět pozitivní vzorky, negativní vzorky a hodnotící linka threshold (prahová hodnota cyklu). Tato linka se nastavuje automaticky a je důležitá hlavně pro nálezy nízké hladiny RNA ve vzorku. Odečet kvantity vzorků se provádí ve fluorescenčním kanále Green. Na ose x je uveden čas (v počtu cyklů) a na ose y hodnota fluorescence. Čím je vzorek pozitivnější, tím dříve se na ose x začne zvedat fluorescenční křivka.



Obr. č. 8: Kalibrační křivka

Kvantitu pozitivních vzorků je možno spočítat podle standardní kalibrační křivky (obr. č. 8), která je složená ze standard o známé kvantitě dané výrobcem. Přístroj Rotor Gene Q vyhodnotí standardy a sestrojí lineární kalibrační křivku, podle které jsou vyhodnoceny vzorky o neznámé koncentraci. Lineární oblast kvantifikace s ohledem na izolaci se vztahuje na koncentrace od 65 IU/ml do maximálně 10⁶ IU/ml.

QS1 – 1.10⁴ UI/ml

QS2 – 1.10³ UI/ml

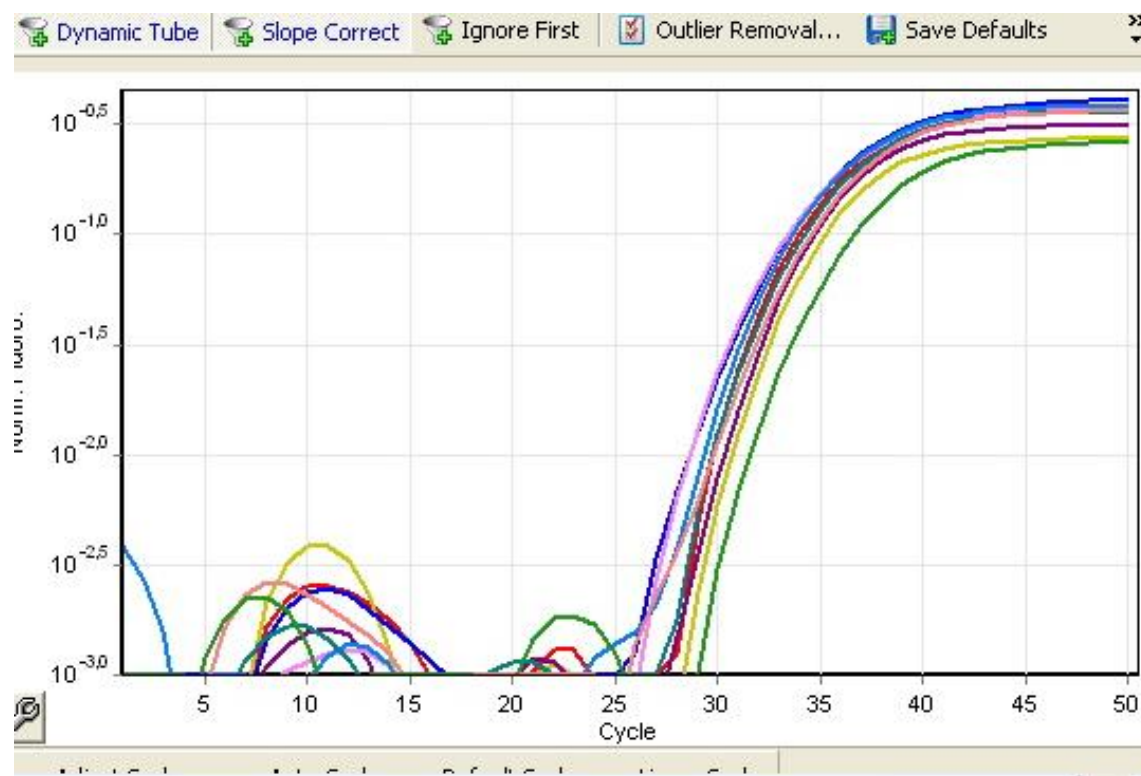
QS3 – 1.10² UI/ml

QS4 – 1.10¹ UI/ml

No.	Name	Type	Ct	Given Conc (IU/l)	Calc Conc (IU/ul)	% Var	Rep. (▲)
1	vzorek1	Unknown	28,30		4,51E+02		:
2	vzorek2	Unknown					:
3	vzorek3	Unknown	25,64		2,76E+03		:
4	vzorek4	Unknown	38,66		3,88E-01		:
5	QS HCV1	Standard	23,74	1,00E+04	1,00E+04	0,5%	:
6	QS HCV2	Standard	27,14	1,00E+03	9,90E+02	1,0%	:
7	QS HCV3	Standard	30,50	1,00E+02	1,00E+02	0,5%	:
8	QS HCV4	Standard	33,89	1,00E+01	1,00E+01	0,0%	:
9	Neqat kontr	Neqative					:

Obr. č. 9: Tabulka naměřených dat.

Na obrázku č. 9. vidíme tabulku, ve které jsou uvedeny cykly, ve kterých jednotlivé vzorky protly prahovou linku. Zároveň je vidět odchylka (v%) od dané koncentrace standard a reálně naměřené koncentrace standard. Z přístrojem naměřených dat (sloupec 6) se podle vzorce uvedeného v metodice vypočítá reálná hodnota množství RNA, která je vyjádřena v počtu mezinárodních jednotek vztažených na 1 mililitr vzorku (IU/ml).



Obr. č. 10: Amplifikační křivky IC

Prováděná PCR obsahuje interní kontrolu (obr. č. 10), která se používá jako kritérium při hodnocení negativního vzorku. V případě, že nedošlo k amplifikaci virové RNA, je možné vzorek považovat za negativní pouze v případě, že došlo k amplifikaci interní kontroly. Pokud k amplifikaci IC nedoje, byla ve vzorku inhibice PCR. Takový vzorek nelze hodnotit.

Na obrázku č. 8 vidíme, že v této reakci k inhibici nedošlo, všechny IC (interní kontroly) jsou pozitivní.

4.3 Kvantitativní hodnocení izolačních souprav

Pro zvolení optimálního izolačního postupu pro správnou kvantifikaci HCV jsem porovnála dvě různé izolační soupravy High Pure Viral RNA kit (firma ROCHE) a QIAamp Viral RNA mini kit (firma QIAGEN). Byl vybrán soubor osmi pozitivních vzorků, přičemž každá izolace byla kvantifikována dvakrát. Výsledky můžeme vidět v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Naměřené hodnoty kvantity

Vzorek	Higt Pure Viral RNA kit (firma ROCHE)	QIAamp Viral RNA mini kit (firma QIAGEN)
1	1,50.10 ³ 1,73.10 ³	1,38.10 ⁴ 1,52.10 ⁴
2	2,88.10 ⁴ 2,43.10 ⁴	5,91.10 ⁵ 5,43.10 ⁵
3	2,38.10 ² 2,77.10 ²	1,63.10 ³ 1,20.10 ³
4	5,95.10 ⁴ 6,03.10 ⁴	6,99.10 ⁵ 7,03.10 ⁵
5	2,79.10 ² 3,89.10 ²	2,39.10 ³ 4,36.10 ³
6	6,98.10 ³ 7,88.10 ³	1,02.10 ⁴ 2,89.10 ⁴
7	3,26.10 ⁴ 4,04.10 ⁴	3,56.10 ⁵ 2,15.10 ⁵
8	4,62.10 ² 4,05.10 ²	4,52.10 ³ 4,08.10 ³

Byla provedena statistická analýza pomocí párového T testu. Byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi kvantitami získanými izolací dvěma různými kity. Na hladině významnosti < 0,01% tak popírám nulovou hypotézu, že výsledky hodnot kvantit HCV RNA izolovaných dvěma různými soupravami jsou shodné.

5. Diskuse

Průkaz přítomnosti virové RNA v krvi pacienta je velice důležitá součást lékařské diagnostiky. Kvalitativní průkaz pomocí nested PCR je rychlou a velice citlivou metodou pro skríníng pacientů s podezřením na hepatitidu C. Vzhledem k opožděné tvorbě protilátek a nižší citlivosti detekce antigenu je PCR průkaz HCV nezbytný pro záchyt zejména pacientů s akutní hepatitidou. Výsledek PCR HCV na agarózovém gelu nám ukazuje pozitivitu a negativitu vzorků. Rozdíly v průkazu virové RNA po prvním, popřípadě až po druhém kole PCR, umožňují semikvantitativní hodnocení virové nálože (silná a slabá pozitivita).

Kvaticfikace virové RNA je velice důležitá zejména pro nasazení a sledování účinnosti léčby. V současné době je doporučovaná dlouhodobá léčba pegylovaným interferonem a ribavirinem. Jelikož je tato terapie pro pacienty poměrně náročná a obtížná, lékař musí vždy zvážit, zdali je pacient vhodný pro tuto léčbu. V úvahu jsou brána kritéria jako je např. věk a pohlaví pacienta, jeho genotyp (mutace v genu pro IL28B – horší odpověď na léčbu), typizace viru a hladina virémie. Po zahájení terapie jsou pacienti pravidelně monitorováni na kvantitu virové RNA, která slouží jako marker úspěšnosti léčby.

Proto jsou při vyšetření hladiny virémie kladeny velice přísné požadavky na detekční limit analyzačních souprav a přítomnost interních kontrol inhibice PCR. Jako vhodnou diagnostickou soupravu pro kvantitu jsme v naší laboratoři začali používat HCV RG RT – PCR kit od firmy QIAGEN. Výrobce však doporučoval jinou soupravu na izolaci virové RNA, nežli tu, kterou jsme rutinně používali. Provedla jsem tedy na souboru osmi vzorků srovnání účinnosti izolace souprav High Pure Viral RNA kit (ROCHE) a QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN). Z výsledků jasně vyplývá, že výrobcem požadovaná izolační souprava dává řádově vyšší hodnoty po provedení kvantifikace. Tyto výsledky byly prokazatelné u všech měření. Přibližně desetinásobné rozdíly výtěžku RNA byly u všech analyzovaných vzorků, bez ohledu na úroveň virémie. Toto dokazuje statistická analýza provedená párovým T testem, kde byla dosažena hodnota hladiny významnosti menší než 0,01.

Rozdíly v naměřených hladinách získaných izolací soupravou firmy ROCHE a QIAGEN lze vysvětlit nejspíše vyšší účinností izolace u soupravy QIAGEN. Soupravy se navzájem liší množstvím materiálu vstupujícím do izolace, různými roztoky používanými při promývání i výsledným elučním objemem. Toto vše nejspíše ovlivní konečný výtěžek RNA. Zároveň může mít vliv i to, že výrobce kvantifikační soupravu optimalizoval zejména na svůj izolační kit, je tedy možné, že izoláty získané jinými soupravami mohou být ovlivněny chemickými činidly použitými při izolaci (zbytkový etanol, pH a složení elučního pufu).

Na základě tohoto porovnání jsme zvolili jako standardní metodu izolace QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) pro kvantifikaci viru hepatitidy C soupravou Artus HCV RG RT – PCR kit (QIAGEN).

6. Závěr

Stanovení kvantity viru hepatitidy C v krvi je velmi důležitá informace pro lékaře při zahájení léčby interferonem a hlavně při sledování její účinnosti. Jelikož je tato léčba velice náročná a zatěžující, jsou kritéria na laboratorní vyšetření velice přísná. Proto je nutné používat takové metody, které jsou velice citlivé a poskytují tak co nejpřesnější hodnoty sledovaných parametrů.

V této práci jsem chtěla porovnat účinnost dvou komerčně dodávaných souprav pro izolaci virové RNA. Pro izolaci byly použity soupravy High Pure Viral RNA kit - výrobce ROCHE, a QIAamp Viral RNA mini kit - výrobce QIAGEN. Pro porovnání byl použit soubor pozitivních vzorků, které se lišily množstvím virové nálože a celkem odrážely kvantitu pozorovanou u klinických vzorků. Byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi soupravami, přičemž souprava QIAamp Viral RNA mini kit vykazovala vyšší výtěžky RNA. Tato souprava byla zvolena jako vhodná pro izolaci HCV RNA s následnou kvantifikací kitem Artus HCV RG RT - PCR kit. Tento metodický postup je v současnosti používán pro rutinní kvantifikaci vzorků a je součástí akreditované metody pro detekci HCV.

Je pravděpodobné, že se zkvalitňováním lékařské péče bude narůstat počet požadavků na určení hladiny virémie HCV a bude tudíž zapotřebí alespoň částečně automatizovat celý proces vyšetření. Jednou z možností je použití izolátorů nukleových kyselin. Jak se ukázalo při vypracování této práce, je nezbytné důkladné testování souprav před jejich zařazením do rutinní diagnostické praxe.

7. Seznam použité literatury

1. BELD, M., et al. Performance of the new Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and serum: conversion to international units and comparison with the Roche COBAS Amplicor HCV. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, , no. 40, p. 788–793.
2. BENEDÍK, J., et al. Molekulární diagnostika infekčních stavů.. *Časopis lékařů českých*, 2003, vol. 142, no. 2, p. 75–79.
3. BOUCHARDEAU, F., et al. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the INNO-LiPA HCV assai.. *J. Clin Microbiol.*, 2007, vol. 45, p. 1140–1145.
4. BUCKWOLD, V., et al. Synergistic in vitro interactions between alpha interferon and RBV against bovine viral diarrhoea virus and yellow fever virus as surrogate models of hepatitis C virus replication.. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2003, vol. 47, p. 2293–2298.
5. BUSTIN, S. A-Z of quantitative PCR. *International University*, 2004, vol. 5, p. 141–432.
6. COLIN, C., et al. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat*, 2001, vol. 8, p. 87–95.
7. GALSKÝ, J., et al. Diagnostika a léčba chronické virové hepatitidy C (HCV) Doporučený postup České hepatologické společnosti a Společnosti infekčního lékařství z roku 2002.. *Klinická mikrobiologie infekčního lékařství*, 2003, vol. 9, p. 54–56.
8. HALFON, P., et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene).. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, p. 1771–1773.
9. HORVÁTH, R., et al. Molekulárně biologické diagnostické metody v klinické mikrobiologii. *Sborník, Celostátní konference mikrobiologie a epidemiologie, Břeclav 9. - 11.10.2000*, 2000, p. 16.

10. HUSA, P. *Virové hepatitidy*. 1st ed. Praha: Galén, 2005. 230 p. ISBN 80-246-04523.
11. HUSA, P. Současné možnosti léčby virových hepatitid. *Interní medicína pro praxi*, 2005, vol. 7-8, p. 342–345.
12. HUSA, P. Virová hepatitida C. *Klin Farmakol Farm*, 2009, vol. 23, no. 1, p. 30–34.
13. LEE, S. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, p. 4171–4179
14. KOZLOVÁ, L. *Jak psát bakalářskou a diplomovou práci*. 2. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2009. 55 s. ISBN 978-80-7394-155-0.
15. KRAMÁŘ, R. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2007. 73 s. ISBN 978-80-7394-021-8. .
16. NĚMEČEK, V. Sérologický přehled ČR v roce 2001 - virová hepatitida A,B,C. *Zprávy CEM*, 2003, vol. 12, p. 55–61.
17. OKAMOTO, M., et al. Detection of hepatitis C virus genome in human serum by multi-targeted polymerase chain reaction. *Journal of medical Virology*, 1993, vol. 41, no. 1, p. 6–10.
18. PRŮŠA, R. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 1. vyd. Praha: Lambda Bio-Med, 1997, 45 s. ISBN 80-238-0940-7.
19. ROŽNOVSKÝ, L. Virové hepatitidy u dětí a mladistvých a jejich prevence vakcinací. *Pediatr. pro praxi*, 2007, vol. 8/4, p. 228–230.

20. SARRAZIN, C. Assessment, by transcription-mediated amplification, of virologic response in patients with chronic hepatitis C virus treated with peginterferon α -2a. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, p. 2850–2855.
21. SY, T. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*, 2006, vol. 3, p. 41–46.
22. ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1
23. THIO, C., et al. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, p. 575–577.
24. URBÁNEK, P. *Infekce virem hepatitidy C*. 1st ed. Praha: Galén, 2004. 220 p. ISBN 80-7262-278-1.
25. URBÁNEK, P. Infekce virem hepatitidy C. *Remedia*, 2005, no. 15, p. 75–83.
26. URBÁNEK, P. Současné možnosti a očekávaný vývoj terapie chronické infekce virem hepatitidy C. *Remedia online*, 2007, vol. 4,
27. URBÁNEK, P., et al. Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV). *Časopis Lékařů Českých*, 2008, vol. 146, no. I–XI,
28. URBÁNEK, P. Současné možnosti a očekávaný vývoj terapie chronické infekce virem hepatitidy C. *Remedia online*, 2007, vol. 4,
29. URBÁNEK, P. Novinky v terapii chronické infekce virem hepatitidy C. *Remedia online*, 2011, vol. 5,
30. URBÁNEK, P. Optimální léčba chronické HCV infekce s použitím přímo působících virostatik. *Remedia online*, 2013, vol. 1,
31. VOTAVA, M., et al. Polymerázová řetězová reakce v mikrobiologické diagnostice. *Praktický lékař*, 2000, vol. 80, no. 11, p. 632–634. ISSN 0032-6739.

32. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: NEPTUN, Březová 18, 637 00 Brno, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

33. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.

Klíčová slova

Hepatitida C

PCR

Kvalitativní průkaz

Kvantitativní průkaz