



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Molekulárna detekcia hepatitídy C u vybranej skupiny pacientov

BAKALÁRSKA PRÁCA

Študijný program: [Zdravotní laborant](#)

Autor: Daniela Kalinayová

Vedúci práce: Ing. Tereza Fiedlerová, Ph.D.

České Budejovice 2020

Prehlásenie

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu s názvom „ Molekulárna detekcia hepatitídy C u vybranej skupiny pacientov“ som vypracovala samostatne iba s použitím prameňov v zozname citovanej literatúry

Prehlasujem, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platnom znení súhlasím so zverejnením svojej bakalárskej práce, a to v neskrátenej podobe elektronickou cestou vo verejne prístupnej časti databázy STAG prevádzkovej Juhočeskou univerzitou v Českých Budejoviciach a na jej internetových stránkach, a to so zachovaním môjho autorského práva k odovzdanému textu tejto kvalifikačnej práce. Ďalej súhlasím s tým, aby tou istou elektronickou cestou boli v súlade s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zverejnené posudky školiteľa a oponenta práce aj záznam o priebehu a výsledku obhajoby bakalárskej práce. Taktiež súhlasím s porovnaním textu mojej bakalárskej práce s databázou kvalifikačných prác Theses.cz prevádzkovanou Národným registrom vysokoškolských kvalifikačných prác a systémom na odhaľovanie plagiátov.

V Českých Budejoviciach dňa

podpis

Pod'akovanie

Rada by som touto cestou pod'akovala mojej vedúcej bakalárskej práce Ing. Tereze Fiedlerovej, Ph.D. za ochotu, cenné rady a venovaný čas pri písaní tejto práce.

Molekulárna detekcia hepatitídy C u vybranej skupiny pacientov

Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá výskytom hepatitídy C a jeho detekciou zameranou na priamy dôkaz vírusu. Teoretická časť popisuje a rozdeľuje hepatitídu na akútnu a chronickú, zameriava sa na jej genetickú variabilitu a vysvetľuje ako sa tento vírus správa, prenáša a mutuje. Mutáciou vznikajú jeho ďalšie varianty, ktoré je potrebné od seba odlíšiť ak chceme nastaviť účinnú liečbu.

Praktická časť nám podáva informácie o výskyte HCV medzi mužmi a ženami, ktorý sú prehľadne rozdelení v tabuľkách podľa roku narodenia, pozitivity a negativity. Zaoberá sa tiež aj dourčením daného genotypu/subtypu.

Kľúčová slova

Vírus hepatitídy C, Real-time PCR, HCV genotyp, sekvenovanie

Molecular diagnostics od hepatitis C in a selected group of patients

Abstract

This bachelor thesis deals with the occurrence of hepatitis C and its detection focused on direct evidence of the virus. The theoretical part describes and divides hepatitis C into acute and chronic, focuses on its genetic variability and explains how this virus behaves, is transmitted and mutated. Mutation creates other variants of it, which must be distinguished from each other if we want to set up an effective treatment.

The practical part gives us information about the incidence of HCV among men and women, which are clearly divided in tables according to the year of birth, positivity and negativity. It also deals with the determination of a given genotype / subtype.

Key words

Hepatitis C virus, Real-time PCR, HCV genotype, sequencing

Obsah:

1. Úvod	8
2. Súčasný stav	9
2.1 Pribeh HCV infekcie	10
2.1.1 Akútna infekcia	10
2.1.2 Chronická infekcia	10
2.1.2.1 Liečba chronickej hepatitídy C	11
2.2 Molekulárna virológia	12
2.2.1 Štruktúra genómu HCV	12
2.2.2 Genetická variabilita HCV	13
2.2.3 Genotypy hepatitídy C	14
2.3 Laboratórna diagnostika HCV	14
2.3.1 Detekcia anti-HCV protilátok	15
2.3.2 Detekcia HCV RNA	15
2.3.2.1 Taqman	16
2.4 Izolácia RNA	17
2.4.1 Izolácia na prístroji QIASymphony	17
2.4.2 Diagnostika HCV (Panther)	19
3. Ciele	21
4. Metodika	22
4.1 Izolácia RNA pomocou QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini kit	22
4.1.1 Detekcia pomocou artus HCV RG RT-PCR kit	23
4.2 Detekcia pomocou TMA (Panther)	26
4.3 HCV Genotype plus Real-time (Sacace BIOTECHNOLOGIES)	27
4.4 Určenie HCV genotypu/subtypu pomocou sekvenovania	29
4.4.1 Príprava agarózového gélu a separácia fragmentov	31

4.4.2	<i>Purifikácia PCR produktov</i>	33
4.4.3	<i>Sekvenačná reakcia</i>	33
4.4.4	<i>Zrážanie sekvencií</i>	34
4.4.5	<i>Sekvenovanie</i>	34
5.	Výsledky	36
6.	Diskusia	46
7.	Záver	47
8.	Literatúra	48
9.	Zoznam obrázkov	52
9.1	Zoznam obrázkov	52
9.2	Zoznam tabuliek	53
10.	Zoznam skratiek	54
11.	Prílohy	55

1. Úvod

V mojej bakalárskej práci sa budem zaoberať diagnostikou hepatitídy C. V bežnej populácii sa často nevyskytuje, pretože pri dodržaní určitých hygienických a aseptických pravidiel sa dá prenosu infekcie zabrániť. Táto práca zohľadňuje výskyt hepatitídy C u vybranej skupiny pacientov, a to u bývalých narkomanov a väzňov v Českej republike. Prevalencia ochorenia je tak vyššia ako u bežnej populácie, pretože sa často jedná o bývalých užívateľov drog, alebo ľudí so sociálne slabších skupín.

Priamou detekciou hepatitídy C vieme zachytiť aj rannú fázu ochorenia, kedy organizmus ešte nemusí mať vytvorené protilátky. Pre správne nastavenie liečby je dôležité určiť aj o aký genotyp, príp. subtyp sa jedná.

V praktickej časti sa zaoberám molekulárnou detekciou HCV metódou PCR. Daný súbor pacientov bol vyšetrení na prístroji QIASymphony aj na prístroji Panther, ktorý používa metódu TMA. V závere porovnávam tieto metódy podľa ich citlivosti zachytiť aj nízku vírusovú nálož. Počas mojej laboratórnej praxe som taktiež dourčila genotypy/subtypy na základe pozitivity pacientov metódou Real-TM PCR alebo sekvenovaním. Výsledky som spracovala do grafov a tabuliek, podľa pohlavia, roku narodenia a výskytu daného genotypu/subtypu.

2. Súčasný stav

Vírus hepatitídy C (VHC) je RNA vírus, ktorý patrí medzi flavivírusy. Vírus bol objavený v roku 1989. (Špičák J. a kol., 2017.) Vyznačuje sa veľkou genetickou variabilitou a veľkým množstvom mutácií počas priebehu infekcie. VHC sa vyskytuje v 11 rôznych genotypoch, pričom genotypy 7 – 11 sa považujú za subtypy genotypu 6. (MeDitorial © 20220). Niektorí autori uvádzajú výskyt 7 rôznych genotypov (genotypy 1 – 7) (Urbánek, 2017) . VHC má niekoľko desiatok subtypov. Subtypy sa označujú malými písmenami abecedy. V Českej republike sa najčastejšie vyskytuje subtyp 1b. (Husa, 2005.)

VHC je známy od konca 80.rokoch 20. storočia. Predstavuje závažný globálny problém a celosvetovo sa vyskytuje asi u 170 miliónov ľudí. Najviac sa vyskytuje vo východnej Európe a Ázii, ale taktiež aj v USA, južnej Amerike a v niektorých štátoch v Afrike. (obr. č. 1 -príloha) (Gower E a kol.,2014)

Podľa serologických výsledkov je prevalencia infekcie HCV v Českej republike nízka a to iba 0,2 %. Infekcia HCV sa väčšinou vyskytuje u rizikových skupín obyvateľstva, než u bežnej populácie. Serologicky sa však nezachytí v dostatočnom počte, takže je pravdepodobné, že prevalencia je oveľa vyššia. (Souček a kol., 2011) V Českej republike bolo v období 2006 – 2015 nahlásených 7 577 prípadov chronickej hepatitídy C. V roku 2015 bolo hlásených až 840 prípadov. Najohrozenejšou skupinou sú injekční užívatelia drog. (Lexová a kol., 2016)

Vírus poškodzuje bunku dvoma spôsobmi a to priamo – tzv. cytopatický efekt a nepriamo pomocou imunitnej reakcie na infikovanú bunku – tzv. cytolitický efekt. (Fialová, © 2019)

Vírus hepatitídy C sa prenáša parenterálnou cestou, to znamená krvou, telesnými tekutinami, pohlavným stykom . Prenos je možný aj z matky na dieťa počas pôrodu. Dialyzační, onkologickí pacienti, alebo pacienti, ktorým boli podávané krvné deriváty majú zvýšené riziko infekcie vírusom. Avšak, vďaka dnešným opatreniam a pravidelným testovaniam krvi pred samotným podaním pacientom, sa toto riziko výrazne znížilo. Dopomohlo k tomu aj zahájenie rutinného testovania darcov krvi na prítomnosť HCV infekcie. (Špičák J. a kol., 2017) Ohrozenou skupinou zostávajú narkomani a ľudia zo

sociálne slabších skupín. Rizikovým aspektom sú aj tetovania a piercing, ak nie sú prevádzané za aspetických podmienok. (Souček a kol., 2011)

2.1 Pribeh HCV infekcie

2.1.1 Akútna infekcia

Akútna hepatitída je diagnostikovaná veľmi vzácne, pretože väčšinou má ochorenie bezpríznakový priebeh. Približne, v asi 10 – 15 % prípadov sa objavia nešpecifické príznaky ako je únava, bolesti svalov, nechutenstvo. Ikterický priebeh infekcie sa popisuje u 1 % pacientov. (Urbánek, 2017)

Približne u 55 – 80 % pacientov prechádza akútna hepatitída do chronicity. Riziko chronicity závisí na veku, preto mladší ľudia majú menšie riziko. Ďalej závisí aj na spôsobe prenosu, teda veľkosti infekčnej dávky a ďalších návykov (užívanie alkoholu). Dôležitým faktorom je tiež aj koinfekcia s hepatitídou B alebo HIV, ktorá výrazne prispieva k tomuto rozvoju. (Fialová, © 2019)

2.1.2 Chronická infekcia

Chronická hepatitída a často aj cirhóza pečene, prebiehajú asymptomaticky a väčšinou dochádza k odhaleniu náhodne. Do chronicity prechádza okolo 75 – 85 % prípadov. Za chronicky infikovaného pacienta sa považuje ten, ktorý má po 6 mesiacoch pozitívne sérum na HCV RNA. (Urbánek, 2017)

Toto vyšetrenie stanovujeme pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Pravdou je, že pacient nemusí mať pozitívne sérum na HCV RNA, ale iba protilátky anti-HCV, čo značí prekonanie infekcie, alebo stav kedy ochorenie neprešlo do chronicity. (Husa, 2009)

U chronickej hepatitídy C sú špecifické T-lymfocyty vyčerpané a prestávajú si plniť svoju funkciu. Ako výsledok dlhotrvajúceho ochorenia sa znižuje ich proliferačná schopnosť, cytolitická aktivita a je potlačená produkcia cytokínov. (Shin E a kol., 2016)

U chronickej hepatitídy sledujeme 3 hlavné parametre:

- Vývoj fibrózy pečene do cirhózy pečene
- Rozvoj cirhózy pečene a následne transplantácia pečene
- Rozvoj hepatocelulárneho karcinómu (HCC)

Cirhóza pečene vzniká ako dôsledok fibrózy pečene. Dôsledok toho dochádza k závažným komplikáciám ako je hypertenzia, zlyhávanie pečene s možnosťou transplantácie, alebo vznik HCC. (Urbánek, 2017)

Po 20 rokoch od začiatku choroby, dochádza u 10 – 20 % pacientov k rozvoju cirhózy pečene. Pravdepodobnosť cirhózy zvyšuje alkohol, obezita, vek a koinfekcia s hepatitídou B alebo HIV. Hepatocelulárny karcinóm sa vyskytuje u 1 – 4 % pacientov s cirhózou pečene ročne. U pacientov bez cirhózy sa karcinóm vyskytuje veľmi ojedinele. Obr.č. 1. (Husa, 2009)



Obrázok 1. Priebeh HCV infekcie (Upravené podľa: Chen, Morgan, 2006).

2.1.2.1 Liečba chronickej hepatitídy C

Donedávna bola liečba hepatitídy C založená na kombinácii pegylovaného interferónu a ribavirínu. Úspešnosť liečby tak vzrástla na 70-80 %. (Souček a kol., 2011)

Dnes sa do popredia dostávajú priamo pôsobiace virostatiká (DAA) z ang. directly acting antivirals. Tieto DAA si našli využitie nie len v liečbe HCV, ale aj pri transplantácií pečene. (Souček a kol., 2011)

DAA sú nízkomolekulárne látky, ktoré cielene blokujú jeden z kľúčových enzýmov replikačného cyklu HCV, a to proteázu alebo RNA polymerázu. Jednotlivé DAA sa delia do jednotlivých tried podľa chemickej povahy. (Urbánek, 2017)

Prvými preparátmi DAA, ktoré sa začali bežne v praxi používať sú boceprevir a telaprevir. Tieto virostatiká predstavujú prvú generáciu virostatík. Používajú sa spolu s pegylovaným interferónom a ribavirínom. Účinkujú len u HCV genotypu 1, na ostatné genotypy nemajú žiadny účinok, alebo len veľmi slabý, a aj to s rizikom vzniku virologickej rezistencie. (Urbánek, 2017)

Neskôr vznikli aj ďalšie virostatiká, napr. sofosbuvir, simeprevir a daclatasvir, ktoré dosahujú lepšie účinky na liečbu hepatitídy C. (Urbánek a kol., 2014)

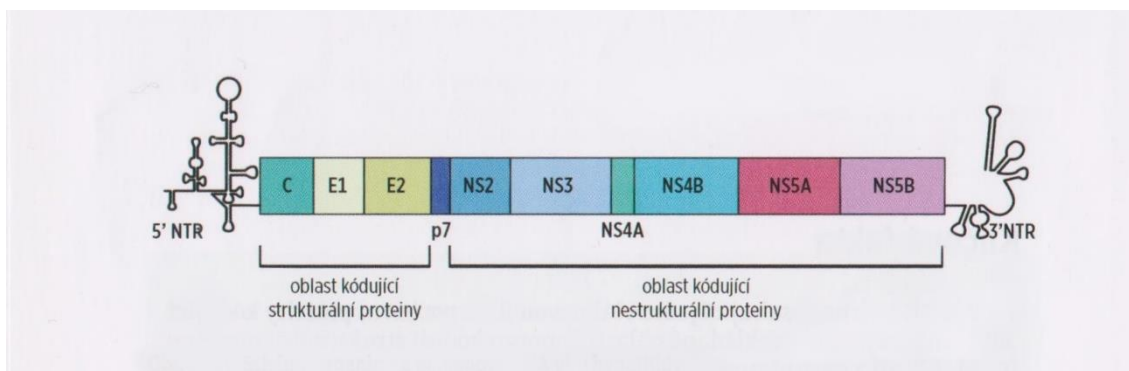
V dnešnej dobe sa snažíme o tzv. bezinterferónovú liečbu, ideálne aj bez podania ribavirínu. Táto liečba je ekonomicky náročná a v popredí ostávajú liečebné postupy založené na pegylovanom interferóne, ribavirínu, bocepreviru a telapreviru. Aj keď je dokázané, že nové varianty sú účinnejšie a bezpečnejšie. (Urbánek a kol., 2014)

2.2 Molekulárna virológia

2.2.1 Štruktúra genómu HCV

Vírus hepatitídy C je RNA vírus veľkosti 55 – 65 nm, ktorý patrí do čeľade Flaviridae (Krekulová a kol., 2002) ako jediný člen rodu Hepatocivirus. Vírus sa skladá z jednovláknovej RNA pozitívnej polarita, ktorá kóduje 3 010 aminokyselín. Genóm HCV môžeme rozdeliť na oblasti, ktoré kódujú štrukturálne a neštrukturálne proteíny a na oblasti nekódujúce proteíny, tzv. neprekladané oblasti (NTR – nontranslated regions, alebo UTR – untranslated regions).

Prekladané oblasti genómu kódujú štrukturálne proteíny (C, E1, E2, p7) a neštrukturálne proteíny (NS2, NS3, NS4S, NS4B, NS5A a NS5B). (Obr. č. 2) (Urbánek, 2017)



Obrázok 2. Oblasti genómu hepatitídy C. (Zdroj: Urbánek, 2017)

Pre RNA vírusy, ktoré obsahujú pozitívne orientovanú RNA je typické, že všetky ich proteíny, hlavne neštrukturálne sa vyznačujú veľkým množstvom funkcií. Jednou z dôležitých funkcií je, že uľahčujú replikáciu vírusu v infikovanom hepatocyte a vznik nových viriónov. Je to dôsledok toho, že genóm HCV je vcelku malý a tiež kóduje malé množstvo proteínov a tie musia mať viacero funkcií. (Urbánek, 2019)

Štrukturálne proteíny spolupracujú s proteínmi hostiteľskej bunky a podieľajú sa na rozvinutí infekcie, rozvoji steatózy a rozvoji inzulínovej rezistencie. Proteíny E1 a E2 sa

spolu so štruktúrami na povrchu hostiteľskej bunky, podieľajú na šírení infekcie v infikovanom orgáne. (Urbánek, 2019)

Neprekladané oblasti (NTR) sa nachádzajú na oboch koncoch genómu a nie sú prekladané do vírusových proteínov. Obsahujú hlavne množstvo regulačných funkcií, rozhodujú o začiatku translácie a o tom, či vlákno RNA vstúpi do procesu translácie, alebo nastane replikácia. Tieto oblasti tiež regulujú začiatok syntézy negatívneho aj pozitívneho reťazca RNA počas replikačného cyklu vírusu. Základný rozdiel medzi týmito oblasťami je ten, že oblasť u 5' konca je veľmi konzervatívna (jej sekvencie sa využívajú v PCR pri detekcii HCV RNA), zatiaľ čo u 3' konca je oblasť vysoko heterogénna. (Urbánek, 2019)

2.2.2 Genetická variabilita HCV

Vírus HCV sa vyznačuje veľkou variabilitou. Tento RNA vírus potrebuje pri svojej replikácii aktivitu RNA-dependentnej RNA polymerázy (RdRp). Aktivita tohto enzýmu je nepresná a preto dcérine vlákna ktoré vytvára, majú na mnohých miestach odlišnú sekvenciu. Tieto dcérine vlákna sa líšia nie len od materskej sekvencie, ale aj od seba navzájom. Na základe sekvenovania genómu HCV, sme schopní ho rozdeliť na 3 úrovne:

1. Genotypy – líšia sa od seba v 30 – 33 % sekvencie nukleotidov
2. Subtypy jedného genotypu – líšia sa 20 – 25 % sekvencie nukleotidov
3. Kvazidruhy jedného subtypu – líšia sa < 10 % sekvencie nukleotidov

Genotypy a subtypy nám predstavujú genetické varianty, ktorými sa líšia medzi sebou regióny, populácie alebo nakazení jednotlivci. Kvazidruhy sú rôzne varianty, ktoré cirkulujú v krvi jedného pacienta. Vírus cirkuluje v danom čase u daného infikovaného pacienta a v jeho krvi sa nachádza množstvo príbuzných ale predsa odlišných sekvencií RNA. Kvazidruhy vznikajú dôsledkom toho, že RdRp nemá proof reading aktivitu. Táto aktivita má dôležitú úlohu pri oprave chybné zaradených nukleotidov do nového reťazca RNA. Pri vysokej replikačnej aktivite a pri chýbaní opravných mechanizmov, nastáva veľké množstvo mutácií. Väčšina však spôsobí zánik reťazca, pretože novo vzniknutý reťazec nie je schopný ďalšej replikácie. (Urbánek, 2017) Vedomosti o mechanizme a vzniku kvazidruhov sú kľúčové pre správne chápanie rozvoja rezistencie na jednotlivé virostatiká. (Urbánek, 2019)

2.2.3 Genotypy hepatitídy C

Schopnosť vírusu mutovať, má za následok výskyt rôznych pozmenených foriem HCV. Tieto pozmenené formy nazývame genotypy. Pomocou sekvenovania genómu HCV, vieme od seba rozlíšiť rôzne genotypy a subtypy. (Hepatitis C Trust ©2020)

Ako som spomínala vyššie, genotypy sa od seba líšia v 30 – 33 % sekvencie nukleotidov a subtypy sa od seba líšia v 20 – 25 % sekvencie nukleotidov. Rôzne typy genotypov sa vo svete vyskytujú typicky pre danú oblasť, avšak toto tvrdenie neplatí vždy. (Urbánek, 2017)

Genotypy 1, 2 a 3 sa vyskytujú celosvetovo. Najčastejšie sa stretávame s ich subtypmi 1a a 1b, ktoré sú zodpovedné za takmer 60 % celosvetových infekcií. Najviac sa s nimi stretávame v severnej Európe, Severnej Amerike, v južnej a východnej Európe a v Japonsku. Genotyp 2 sa vyskytuje menej často oproti genotypu 1. Jeho subtyp 2c prevláda hlavne v severnom Taliansku. Genotyp 3 je endemický v juhovýchodnej Ázii a jeho subtyp 3a sa veľmi často vyskytuje medzi narkomanmi v Európe aj v USA. (MeDitorial © 20220). Genotyp 4 nachádzame prakticky výhradne na Strednom východe, v Egypte a v strednej Afrike. Genotyp 5 je typický pre južnú Afriku. Genotyp 6 sa vyskytuje v juhovýchodnej Ázii a južnej Číne. (Tarik a kol., 2018). Niektorí autori uvádzajú výskyt 11 genotypov, pričom genotypy 7 – 11 sa považujú za subtypy genotypu 6. (MeDitorial © 20220).

Dourčenie HCV genotypu je podstatné pre nastavenie účinnej liečby. Ak sa potvrdí subtyp 1b alebo genotyp 3, znamená to vyššie riziko vzniku cirhózy pečene. Na rôzne genotypy sa používajú rozdielne DAA a líši sa aj dĺžka liečby. (Faisal a kol., 2015)

2.3 Laboratórna diagnostika HCV

Serologické metódy sú kľúčové pre stanovenie správnej diagnózy HCV infekcie. Sú nevyhnutné pre monitorovanie a sledovanie priebehu liečby. Screeningovou metódou je vyšetrenie anti-HCV protilátok zo séra, alebo plazmy. Definitívnu diagnózu určuje pozitívny nález HCV RNA v krvi metódou PCR. (Urbánek, 2017)

2.3.1 Detekcia anti-HCV protilátok

K detekcii anti-HCV protilátok používame metódy známe ako EIA – enzymatické imunoanalýzy. Princíp metódy je založený na hľadaní protilátky v sére pacienta proti antigénom rôznej povahy. Tento antigén, väčšinou sa jedná o proteíny alebo peptidy, je naviazaný na stenu mikrotitračnej jamky. Do jamky sa pridá vyšetrované sérum, inkubuje sa a potom nastáva premývanie, kde sa odplavia všetky nenaviazané častice. V prípade pozitivity hľadanej protilátky v sére, ostanú na stene vytvorené imunokomplexy. Následne sa opäť do jamky pridá protilátka proti imunokomplexu, ktorá má na sebe naviazaný enzým. Tento enzým zmení farbu v jamke po pridaní substrátu. V závere sa výsledok odčíta fotometricky. (Šimek, 2012) Detekcia anti-HCV protilátok má pre nás čisto kvalitatívny charakter.

Vyšetrenie anti-HCV protilátok je screeningové vyšetrenie. Malo by sa vykonávať u všetkých osôb, ktoré boli počas svojho života vystavené, alebo v kontakte s vírusom hepatitídy C. Je potreba pamätať aj na to, že anti-HCV protilátky nemajú protektívny efekt, to znamená, že nechránia proti reinfekcii. (Urbánek a kol., 2014)

2.3.2 Detekcia HCV RNA

Polymerázová reťazová reakcia (z angl. polymerase chain reaction) je v dnešnej dobe nezastupiteľnou molekulárnou metódou pre detekciu patogénov alebo vírusov. (Beránek, 2016)

Samotné PCR sa skladá z 3 fáz:

Denaturácia – teplota stúpne nad 94°C a nastáva rozpletenie dvojvláknovej DNA, pričom vzniká jednovláknovú DNA na ktorú, nasadajú primery

Nasadenie primerov – nastáva pri teplote okolo 60°C na špecifické úseky DNA, kde sa neskôr naviaže DNA polymeráza. Primery by mali byť 18 – 25 báz dlhé a mali by mať rovnomerne zastúpené oblasti pre páry Guanín/Cytozín a Adenín/Tymín/Uracil

Syntéza DNA (elongace) – prebieha samotná syntéza DNA, kde sa vytvára nové vlákno vždy podľa komplementarity k pôvodnému

Tento dej sa cyklicky opakuje 40 – 45 krát a takto nám môže vzniknúť až niekoľko miliónov kópií DNA. (Beránek, 2016)

Real-time PCR je obdoba klasickej polymerázovej reakcie s možnosťou kvantifikovať sledovaný úsek DNA v reálnom čase. Celá reakcia prebieha v špeciálnom prístroji nazývanom termálny cykler (z angl. thermal cycler). Vo vnútri sa nachádza detektor, ktorý prenáša výsledky do počítača. Pomocou špecializovaného programu tak zaznamenávame v reálnom čase koncentráciu fluorescence, ktorá odpovedá množstvu vzniknutého amplikónu. Real-time PCR sa v súčasnej dobe pokladá za najpoužívanejšiu metódu, a používame ju pre detekciu a kvantifikáciu HCV. Pre detekciu množstva DNA sa používajú fluorescenčné substráty, ktoré sa môžu vzájomne líšiť princípom, ale výsledok ostáva rovnaký. (Kočárek, 2007) V našom laboratóriu používame ako zdroj fluorescence Taqman sondy

2.3.2.1 Taqman

Taqman využíva hybridizačné sondy (próby), ktoré sú značené fluorescenčnými farbíkmi. V literatúre sa označujú ako reportér (angl. reporter) a zhášač (angl. quencher). Na 5' konci je naviazaný fluorofor reportéra a na 3' konci je molekula zhášača. Ak sú prítomné obe molekuly, tak fluorescence je inhibovaná, pretože žiarenie reportéra je pohltené zhášačom, a teda neprechádza do detektora. Ak dôjde k odštiepeniu reportéra z próby, jeho fluorescence už nie je inhibovaná a môžeme ju detekovať. (Biopedia ©2020) Na meranie fluorescence je potrebná Taq-polymeráza s 5',3'-exonukleázovou aktivitou. Taq-polymeráza postupuje pozdĺž vlákna RNA, pričom syntetizuje nové vlákno. Ak narazí na sondu, začne z nej odštiepovať nukleotidy, taktiež aj molekulu reportéra, čím sa dostane ďalej od zhášača a ten už nebrzdí emisné žiarenie. Zaznamenávame zväčšujúce sa množstvo fluorescence. (LAB Guide, průvodce laboratoří © 2014 – 2019)

2.4 Izolácia RNA

Izolácia nukleových kyselín môže prebiehať rôznymi spôsobmi, a to ručnou izoláciou, alebo izoláciou na prístroji. Pri veľkom množstve vzoriek samozrejme preferujeme izolovať na izolátoroch. Izolácia sa môže líšiť aj na základe používaného princípu metódy. V tejto práci opisujem 2 metódy, a to izoláciu na prístroji QIASymphony (QIAGEN) a na prístroji Panther (HOLOGIC), ktorý využíva princíp transkripčne sprostredkovanej amplifikácie.

2.4.1 Izolácia na prístroji QIASymphony

QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini kit je súprava obsahujúca reagenty potrebné pre izoláciu a purifikáciu vírusových nukleových kyselín. Tento kit môžeme používať aj pre izoláciu DNA alebo RNA vírusov, ako aj baktérií. QIASymphony pracuje na princípe magnetických častíc. Takto vypurifikované nukleové kyseliny sú pripravené pre ďalšie pracovné postupy ako je napr. spomínaná PCR.

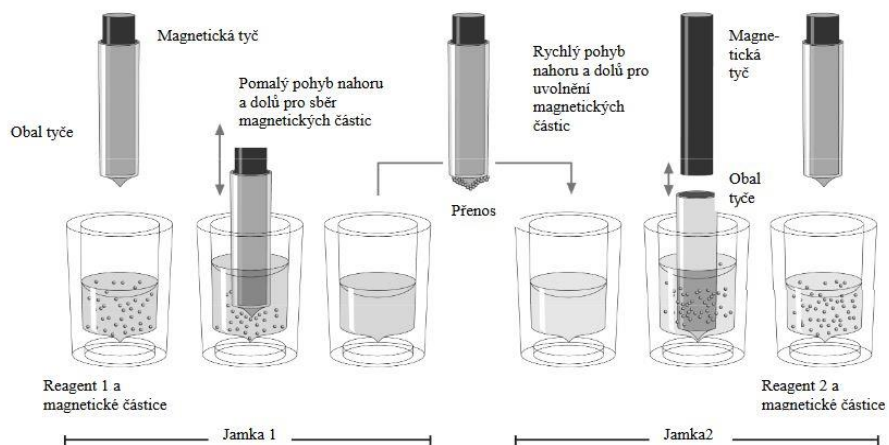
Princíp

QIASymphony izoluje vzorky tak, že kombinuje purifikáciu nukleových kyselín a manipuláciu s magnetickými časticami. Proces purifikácie prebieha tak, aby nedochádzalo k nožnej kontaminácii potenciálne infekčných vzoriek. Skladá sa zo 4 krokov:

1. lýza
2. väzba
3. premývanie
4. eluce

Magnetická tyč je chránená obalom. Tyč sa následne ponorí do jamky, v ktorej sa nachádza vzorka a pritiahne k sebe magnetické častice, ktoré sa v nej nachádzajú. Obal magnetickej tyče sa presunie nad druhú jamku a magnetické častice sa uvoľnia. Tieto kroky sa počas izolácie vzorku niekoľko krát opakujú. Obr.č. 3. (QIAGEN, © 2012)

Následne sa vzorky premývajú v premývajúcich roztokoch a v poslednom kroku získame čistú nukleovú kyselinu. Objem eluátu si vopred zvolíme na základe množstva primárneho materiálu. (QIAGEN, © 2012)



Obrázok 3. Priebek izolácie vzorku. (Zdroj: QIAGEN, © 2012)

2.4.2 Diagnostika HCV (Panther)

Metódu transkripčne sprostredkovej amplifikácie (TMA) používame na priamu detekciu HCV, kde sa nukleová kyselina amplifikuje metódou, ktorá používa RNA transkripciu (RNA polymerázu) a DNA syntézu (reverznú transkriptázu), aby produkovala RNA amplikóny z cieľovej nukleovej kyseliny. TMA môže byť použitá na detekciu ako DNA tak aj RNA. (HOFMANN a kol., 2005)

TMA si nevyžaduje náročnú manipuláciu so vzorkami ako je tomu pri príprave na QIASymphony. Tým sa zabraňuje riziku kontaminácie. (Grifols Diagnostic Solutions Inc., © 2019)

Princíp

Aptima HCV Quant Dx assay je test, ktorý využívame na detekciu nukleovej kyseliny použitím TMA metódy na kvalitatívny a kvantitatívny výsledok. Aptima HCV Quant Dx assay využíva tri hlavné kroky, ktoré prebiehajú v jednej skúmavke:

1. cieľové zachytenie,
2. cieľová amplifikácia pomocou TMA (transcription-mediated amplification),
3. detekcia amplifikovaných produktov (amplikónov) za použitia fluorescenčne značených sond.

Počas cieľového zachytenia je vírusová RNA izolovaná zo vzorky, kde dochádza k rozpusteniu vírusového obalu, denaturácii proteínov a uvoľneniu vírusovej genómovej RNA. Zachytené oligonukleotidy hybridizujú s vysoko konzervatívnymi regiónmi (5' UTR) na HCV RNA. Hybridizované regióny sú zachytené na magnetických mikročasticiach a následne sú odseparované od vzorky v magnetickom poli. Počas premývania sa odstraňujú z reakčnej skúmavky cudzie komponenty.

Cieľová amplifikácia nastáva prostredníctvom TMA za použitia dvoch enzýmov: MMLV (Moloney murine leukemia virus) reverznej transkriptázy a T7 RNA polymerázy. Reverzná transkriptáza sa používa na vytvorenie kópií DNA (obsahuje promotorovú sekvenciu pre T7 RNA polymerázu) cieľovej sekvencie. T7 RNA polymeráza vytvára mnohonásobné kópie RNA amplikónov z kópie DNA templátu. Aptima HCV Quant Dx assay využíva amplifikáciu časti 5'UTR genómu HCV. Amplifikáciu tejto oblasti dosiahneme použitím špecifických primerov, ktoré sú určené pre amplifikáciu genotypov HCV 1,2,3,4,5 a 6.

Detekcia prebieha za pomoci indikátorov z jednovláknovej nukleovej kyseliny. Tie sú prítomné počas cieľovej amplifikácie a špecificky hybridizujú s amplikómom v reálnom čase. Každý indikátor obsahuje fluorofor a zhášač. Ak nie je indikátor hybridizovaný s amplikómom, zhášač je v tesnej blízkosti fluoroforu a potlačuje fluorescenciu. Ak sa indikátor naviaže na amplikón, zhášač sa posunie ďalej od fluoroforu a po excitácii zdrojom svetla začne emitovať signál špecifickej vlnovej dĺžky. Čím viacej indikátorov hybridizuje s amplikómom, tým vyšší je fluorescenčný signál. Doba potrebná k tomu, aby fluorescenčný signál dosiahol stanovenej prahovej hodnoty, je úmerná počiatočnej koncentrácii HCV. Každá reakcia má vnútornú kontrolu - IC (internal control), ktorá kontroluje zmeny v spracovaní vzoriek, amplifikácií a detekcii. (Hologic, Inc., © 2018)

3. Ciele

V praktickej časti sa budem zaoberať a popisovať dve metódy. Najprv opíšem izoláciu RNA na prístroji QIASymphony (QIAGEN) a následnú detekciu pomocou artus HCV RG RT-PCR kitu. Ďalej popíšem detekciu HCV na prístroji Panther (HOLOGIC), ktorý využíva metódu TMA. Výskum pozostáva z 305 pacientov, ktorých porovnam podľa vírusovej nálože a citlivosti daných metód.

V ďalšej časti so súborom 15 386 pacientov porovnavam pozitivitu a negativitu na HCV RNA u mužov a žien. Jedná sa o súbor pacientov z väzníc Českej republiky a bývalých narkomanov. Preto treba zohľadniť získané výsledky v závere práce. Pri pozitivite dourčím genotyp/subtyp metódou Real-Time PCR(SACACE) alebo pomocou sekvenovania. Genotypy rozdelím do grafov a tabuliek na základe výskytu genotypu, pohlavia a roku narodenia pacientov.

4. Metodika

V praktickej časti práce zisťujem pozitívitu HCV RNA v krvi a dourčujem daný genotyp/subtyp. Samotná práca bola vykonaná v laboratóriu synlab czech s.r.o. v Prahe. Najprv popisujem dve rozdielne metódy, a to na prístroji QIASymphony (QIAGEN) a Panther (HOLOGIC). V ďalšej časti sa venujem dourčeniu genotypu a sledujem aký typ sa najviac vyskytuje v Českej republike.

4.1 Izolácia RNA pomocou QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini kit

Pre izoláciu HCV RNA je pre nás najvýhodnejší odber zrážanlivá krv. Zrážanlivú krv uchováваме pri teplote 4 – 8°C. Môžeme použiť aj plnú krv odobranú do EDTA, ale až po predchádzajúcej centrifugácii po dobu 2 minút na 12 500rpm.

Vzorky si zoradíme a prepipetujeme 1 200 µl séra do pripravených skúmaviek. Takto pripravené skúmavky dáme do stojana a vložíme do prístroja. Kapacita jedného stojana je 24 vzoriek. Prístroj QIASymphony dokáže vyizolovať až 96 vzoriek naraz. Pre spustenie izolácie je potrebné si pripraviť reagentie, proteinkinázu, magnety (pred použitím dôkladne pretrepať), a taktiež potrebný počet špičiek s filtrom. Špičky majú dve veľkosti: 200 µl a 1 500 µl. Ďalej je potrebné doplniť Sample Prep Cartridges, 8-well (8 jamkové zásobníky na prípravu vzoriek) a 8-Rod Covers (8 hrotové kryty). Sterilné skúmavky pripravíme podľa počtu vzoriek do elučného stojana. Na obrazovke si zvolíme elučný objem, podľa množstva primárneho materiálu. V našom prípade si nastavíme objem na 60 µl. (QIAGEN, © 2010-2015)

Dôležité je si pripraviť zmes pozostávajúcu z nosičovej RNA (carrier) a pufu AVE. Do čistej skúmavky pipetujeme 1 060 µl pufu AVE a 50 µl carrieru. Do tejto zmesi pridávame aj 10 µl internej kontroly (IC), pre monitorovanie efektivity prípravy vzoriek a následných analýz. (QIAGEN, © 2010-2015)

Pripravený a naplnený stroj QIASymphony začne proces izolácie RNA pomocou magnetických častíc. Izolácia jedného stojana s 24 vzorkami trvá 1,5 hodín, izolácia 2 stojanov trvá 3 hodiny atď. Prístroj je schopný vyizolovať 4 plné stojany, teda 96 vzoriek, za 6 hodín. (QIAGEN, © 2010-2015) (Príloha č. 2)

Po skončení izolácie vyberieme elučné skúmavky s vyzolovanou nukleovou kyselinou. Vyzolovanú RNA môžeme skladovať pri -20°C, alebo hneď pristúpiť k vlastnej PCR reakcii. (QIAGEN, © 2010-2015)

4.1.1 Detekcia pomocou *artus HCV RG RT-PCR kit*

Sada *artus RG RT-PCR kit* (QIAGEN) sa používa pre priamu detekciu HCV RNA metódou PCR v prístrojoch Rotor-Gene Q (QIAGEN). PCR kit *artus HCV* obsahuje RG Master A a RG Master B. Tieto reagenty obsahujú enzýmy pre reverznú transkriptázu a špecifickú amplifikáciu úseku 240bp genómu HCV. Taktiež detegujú špecifický amplifikát vo fluorescenčnom kanále cyclingGreen v prístroji Rotor-Gene Q (zdroj 470 nm, detektor 510 nm). (QIAGEN, © 2015)

Okrem toho sada *artus RG RT-PCR* obsahuje druhý heterologný amplifikačný systém pre dôkaz potenciálnej inhibície PCR. Tento systém je detegovaný ako interná kontrola (IC) vo fluorescenčnom kanále cycling Orange v prístroji Rotor-Gene Q (zdroj 585nm, detektor 610nm). Sada ešte obsahuje 4 pozitívne kontroly (Hep. C RG QS1 – QS4). Pomocou nich sa zostaví kalibračná krivka a určuje sa množstvo vírusovej RNA. (QIAGEN, © 2015)

Pripravíme si master mix v PCR aure do čistej 1,5 ml skúmavky. Potrebné reagenty a množstvo pre 1 vzorku:

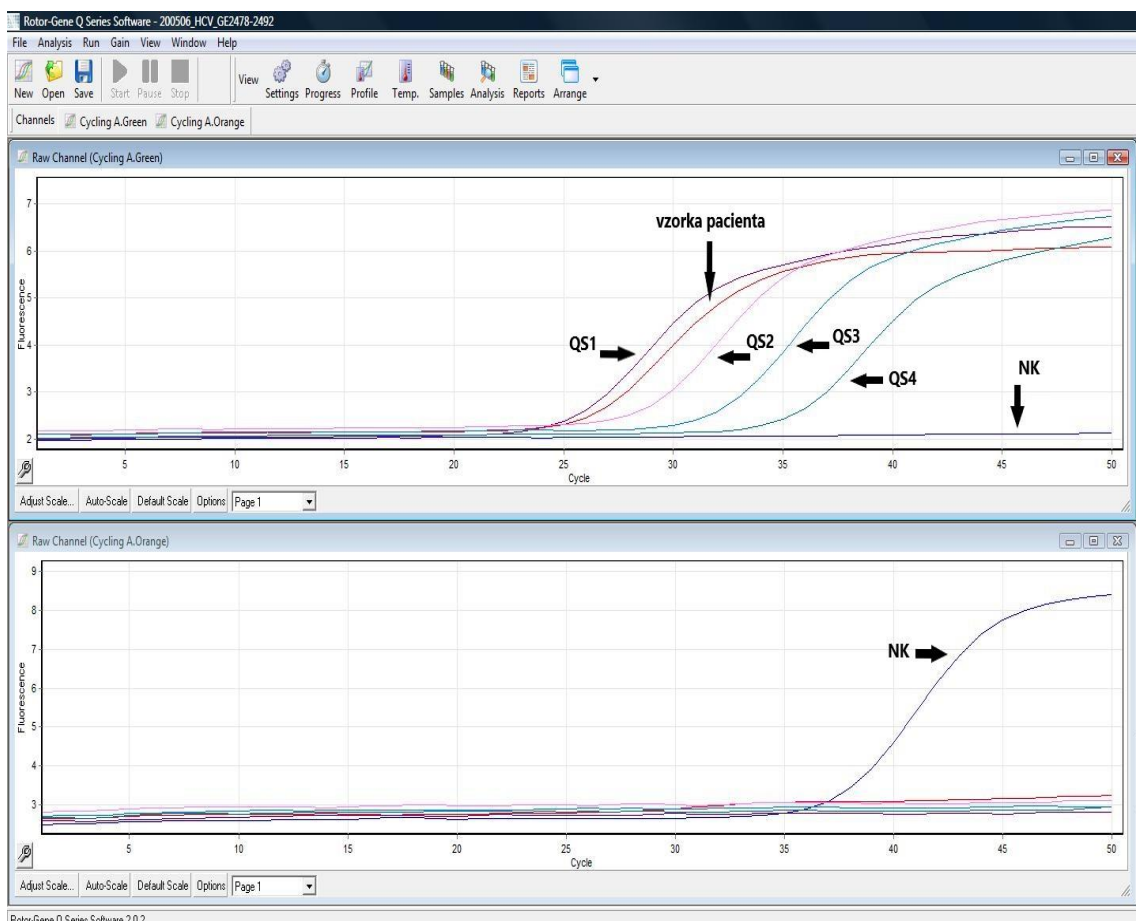
- HCV RG Master A 12 µl
- HCV RG Master B 18 µl

Skúmavku zvortexujeme a stočíme. Master mix pipetujeme do stripov na chladiacej doštičke o objeme 30 µl. Na stole pipetujeme 20 µl negatívnej kontroly a vzoriek do daných pozícií. Objem stripov premiešame niekoľkokrát pipetou. V post-PCR miestnosti pridáme 20 µl pozitívnej kontroly (QS1 – QS4) a tiež premiešame. Stripy zavrieme viečkom a pustíme na vhodnom templáte na Rotor-Gene Q. (QIAGEN, © 2015)

Profil templátu HCV artus:

50°C	30 min
95°C	15 min
50x	
95°C	30 s
50°C	60 s (detekcia fluorescenčného signálu)
72°C	15 s

Vyhodnotenie



Obrázok 4. Výsledok HCV RNA z Rotor-Gene Q (Zdroj: vlastný)

Ak je vzorka pacienta v zelenom kanále negatívna a v oranžovom pozitívna tak, výsledok HCV RNA je negatívny. Ak je v zelenom kanále pozitívna a v oranžovom je pozitívna/negatívna, tak sa uvádza výsledok ako pozitívny. V prípade, ak by bola vzorka v zelenom aj oranžovom kanále negatívna, tak sa považuje výsledok za nevalidný a musí sa opakovať. Oranžový kanál nám slúži ako kontrola správnej izolácie, kvôli pridanej IC. (Obr. č. 4)

Pre ľahšiu interpretáciu výsledkov sa riadime podľa tabuľky, vid' tabuľka č.1. (Synlab czech s.r.o., 2019a)

Tabuľka 1. Vyhodnotenie HCV RNA

vzorek	Zelený kanál	Oranžový kanál	Výsledok
A	NEG	POZ	HCV RNA negatívny
B	POZ	POZ/NEG	HCV RNA pozitívny
C	NEG	NEG	Nevalidný

(Synlab czech s.r.o., 2019a)

Z pozitívnych kontrol si vytvoríme kalibračnú krivku a stanovíme hodnoty v IU/ μ l.

Výpočet vírusovej nálože počítame podľa vzorca (QIAGEN, © 2015) :

$$\text{Výsledok (IU/ml)} = \frac{\text{výsledok} \left(\frac{\text{IU}}{\mu\text{l}} \right) \times \text{elučný objem } (\mu\text{l})}{\text{vstupný objem vzorku (ml)}}$$

4.2 Detekcia pomocou TMA (Panther)

Pre izoláciu a následnú detekciu HCV RNA využívame aj metódu TMA na prístroji Panther. (Príloha č. 3)

Na začiatok si pripravíme si potrebné reagenty, ktoré necháme cca pol hodinu inkubovať pri izbovej teplote a rozmrazíme si potrebné kalibrátory a kontroly. (Obr. č. 5). Reagenty sú od seba odlišené farebne. Obsahujú qHCV Amplification solution, qHCV Enzyme solution, qHCV Promotor solution, qHCV Target capture reagent. Kontroly máme 3, a to negatívnu kontrolu, slabo pozitívnu a vysoko pozitívnu kontrolu a jeden pozitívny kalibrátor. (Hologic © 2001-2017)



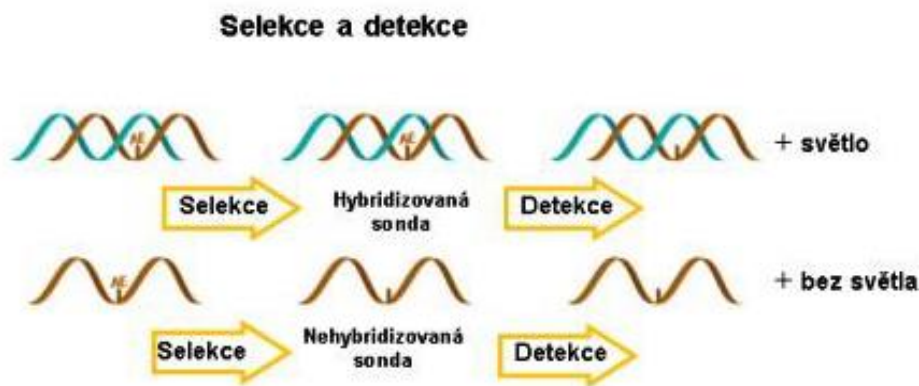
Obrázok 5. Reagenty a kalibrátory. (Zdroj: vlastný)

Prichystané vzorky zoradíme do stojanov a vložíme do prístroja. Do jedného stojana je možné vložiť 15 vzoriek. Prístroj má kapacitu na 120 vzoriek. Výhoda je, že napipetované vzorky je možné vybrať aj počas izolácie a následne vložiť nové vzorky. Týmto sa jeho kapacita mnohonásobne zvýši. (Hologic © 2001-2017)

Izolácia prebieha za pomoci magnetických mikročastíc. Vírusová RNA sa zachytí zo vzoriek a nastáva amplifikácia metódou TMA. Reverzná transkriptáza vytvára kópie DNA a z novej kópie DNA vytvorí dvojreťazcový duplex DNA. RNA polymeráza vytvára ďalšie kópie RNA z DNA templátu procesom transkripcie. Takto vzniknutá amplifikovaná RNA slúži ako templát pre ďalšiu amplifikáciu. Vytvárame tak miliardy kópií za hodinu. (Hologic © 2001-2017)

Ďalej prebieha selekcia a detekcia (obr. č. 6), kde sa amplikóny naviažu na sondy značené molekulou acridinium esteru (AE). Sekvencia sond je špecificky komplementárna k cieľovému ampliónu. Hybridizované sondy rozlišujeme od nehybridizovaných prostredníctvom deaktivácie AE na nehybridizovaných sondách. Počas detekcie meriame

luminometrom signál, ktorý vydáva hybridizovaná sonda. Nastáva emisia fotónov a prítomný svetelný signál zaznamenávame luminometrom. (Hologic © 2001-2017)



Obrázok 6. Analýza s hybridizačnými sondami. (Zdroj: Hologic © 2001-2017)

4.3 HCV Genotype plus Real-time (Sacace BIOTECHNOLOGIES)

Pri pozitívite vzorky dourčujeme jednotlivé genotypy metódou Real-TM PCR. Touto metódou sme schopní zachytiť genotypy 2, 3, 4, 6 a subtypy 1b, 1a, 5a. Vyizolovaná RNA sa musí najprv prepísať na cDNA, tento proces sa nazýva reverzná transkripcia.

I. Reverzná transkripcia

Pripravíme si vzorky, negatívnu kontrolu(NK) a reagentie: RT-G-mix-1, RT-mix a M- MLV. Do čistej skúmavky si pripravíme mix.

Rozpis pre jednu vzorku:

RT-mix	10 μ l
RT-G-mix-1	0,4 μ l
M-MLV	0,5 μ l

Do označených mikroskúmaviek napipetujeme 10 μ l mixu a pridáme 10 μ l RNA vzorky a NK. Mikroskúmavky stočíme a inkubujeme v termocyclery 30 min pri 37°C. Po inkubácii pridáme 20 μ l TE-pufu, zvortexujeme a stočíme. (SACACETM, 2015)

II. Real-time PCR

Pre určenie genotypu si musíme pripraviť 4 mixy: 1b/3, 1a/2, 4/IC, 5a/6. Mixy pipetujeme do čistej 1,5 ml skúmavky.

Rozpis pre jednu vzorku:

PCR-mix-1-FRT HCV (1b/3, alebo 1a/2, alebo 4/IC, alebo 5a/6)	10 µl
RT-PCR-mix-2-TM	5 µl
TaqF polymeráza	0,5 µl

Skúmavku zvertexujeme a stočíme. Pipetujeme 15 µl master mixu do stripov na chladiacej doštičke. Pridáme 10 µl cDNA vzorky a NK. Objem v stripe premiešame pipetou. V post-PCR pridáme 10 µl pozitívnej kontroly (HCV cDNA C+ 1b/3, 1a/2, 4/IC, 5a/6). Stripy zavrieme viečkom a pustíme na Rotor-Gene. (SACACE™, 2015)

Profil PCR reakcie:

95°C		15 min
5x	95°C	5 s
	60°C	20 s
	72°C	15 s
40x	95°C	5 s
	60°C	20 s (detekcia fluorescenčného signálu)
	72°C	15 s

Vyhodnotenie:

Tabuľka 2. Vyhodnotenie HCV Genotype plus Real-RM

Mix	Detekčný kanál	
	FAM (zelený)	JOE (žltý)
1b/3	1b	3
1a/2	1a	2
4/IC	IC	4
5a/6	5a	6

(zdroj: SACACE™, 2015)

Detekčný limit: 1000 IU/ml

Ak sa jedná o subtyp 1b, v master mixe 1b/3, v zelenom kanále detegujeme stúpajúcu krivku. Ak sa jedná o genotyp 3, detegujeme stúpajúcu krivku v žltom kanále. Ak sa jedná o subtyp 1a, v mastemixe 1a/2, v zelenom kanále detegujeme stúpajúcu krivku. Pri genotype 2 detegujeme stúpajúcu krivku v žltom kanále. Ak sa jedná o pozitívny genotyp 4, jeho krivka bude stúpať v žltom kanále a IC bude pozitívna v zelenom kanále. Subtyp 5a bude pozitívny v zelenom kanále a genotyp 6 bude pri pozitivite stúpať v žltom kanále. (SACACE™, 2015)

4.4 Určenie HCV genotypu/subtypu pomocou sekvenovania

Sekvenovaním zisťujeme poradie nukleotidov v reťazci RNA. (Slabý, 2015) Samotnému sekvenovaniu predchádza niekoľko krokov. Vyizolovanú RNA musíme prepísať na cDNA pomocou reverznej transkriptázy použitím Verso cDNA Synthesis kit (THERMOSCIENTIFIC) (synlab czech s.r.o. 2019c)

I. Denaturácia

Pripravíme si vzorky, NK a rozmrazíme reagencie: Random Hexamer. Do 200 µl skúmaviek napipetujeme 4 µl vzorky a 1 µl Random Hexamer. Stočíme a pustíme na PCR cyclery na teplotný profil (synlab czech s.r.o. 2019c):

Profil:

65°C 10min

4° C ∞

II. Reverzná transkripcia

Do čistej skúmavky si pripravíme mastermix. Rozpis pre jednu vzorku (synlab czech s.r.o. 2019c) :

7 µl	H ₂ O Sigma
4 µl	5x cDNA Synthesis Buffer
2 µl	dNTP mix
1 µl	RT Enhancer
1 µl	Verso Enzyme Mix

RT Enhancer a Verso Enzyme Mix pridávame vždy na chladiacej doštičke. Skúmavku zvortexujeme a stočíme. Pipetujeme 15 µl mastermixu ku vzorkám na chladiacej doštičke. Následne opäť pustíme na PCR cycler na profil (synlab czech s.r.o. 2019c):

42°C 45 min

95°C 2 min

4°C ∞

Po skončení programu nasleduje genotypizačná PCR reakcia.

III. Genotypizačná PCR reakcia

Pripravíme si potrebné reagensie: Unipremix I, HCV-3 (HCV-1) genotyp Pmx II a Enzym. Mix pipetujeme do čistej 1,5 ml skúmavky. (synlab czech s.r.o. 2019c)

Rozpis pre jednu vzorku:

Unipremix I	17,4 µl
HCV-3 (HCV-1) genotyp Pmx II	0,4 µl
Enzym (Taq DNA polymerasa A)	0,2 µl

Skúmavku zvoretexujeme a stočíme. Pipetujeme 18 µl master mixu do 200 µl skúmaviek a pridáme 2 µl cDNA, NK. Pustíme na thermocycler na program pre HCV genotyp 03 alebo HCV genotype 01. (synlab czech s.r.o. 2019c)

Profil:

HCV genotyp 03			HCV genotyp 01		
94°C	5 min		94°C	5 min	
42x	95°C	30 s	49x	95°C	30 s
	56°C	45 s		60,5°C	60 s
	72°C	15 s		72°C	45 s
10°C	∞		8°C	∞	

Po skončení PCR reakcie nasleduje elektroforéza, purifikácia produktov z agarózového gélu a sekvenovanie. (synlab czech s.r.o. 2019c)

4.4.1 Príprava agarózového gélu a separácia fragmentov

Elektroforézou separujeme nukleové kyseliny na základe ich veľkosti, zloženia a pohyblivosti v elektrickom poli. Nukleové kyseliny putujú ku kladne nabitému pólu, teda ku anóde. V gélových roztokoch, ktoré vytvárajú sieťovú štruktúru sa rozdelia molekuly na základe tvaru a veľkosti. (Beránek, 2016)

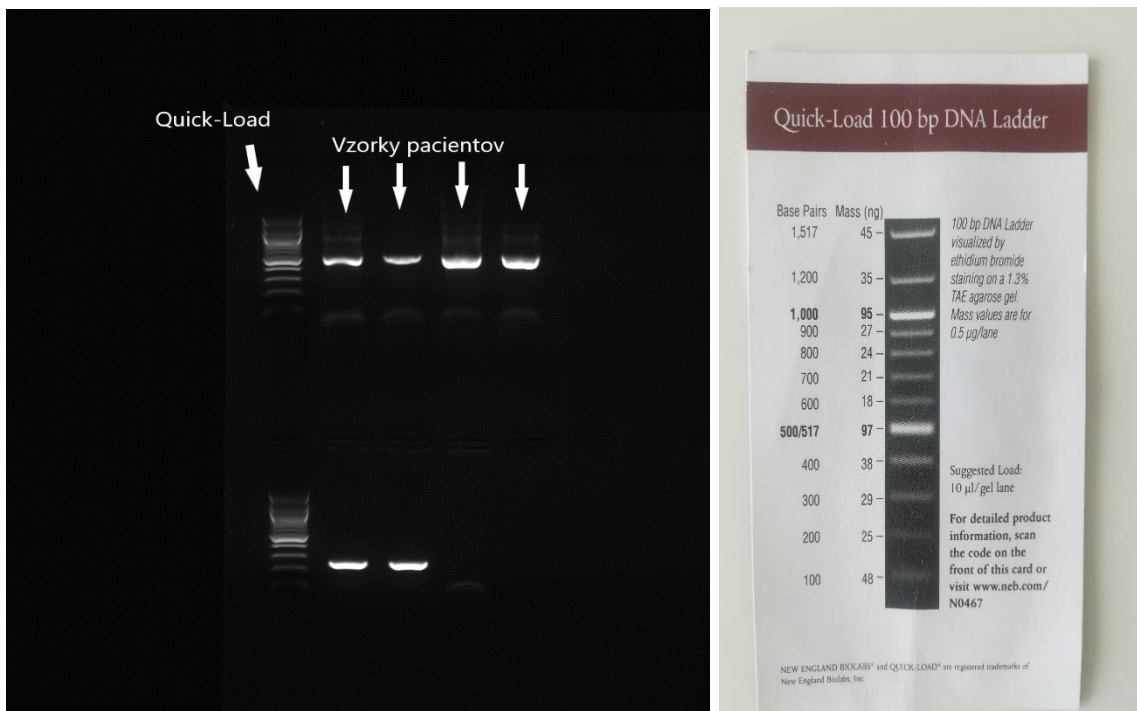
Do prvej jamky sa zvyčajne nanáša štandard molekulových hmotností (ang. DNA Ladder), v ktorom sa nám rozdelia fragmenty RNA podľa presne definovanej veľkosti. Vzorky pipetujeme do jamiek v gély, spolu s farebnou látkou (Loading Dye) ktorá, nám ukáže polohu vzorky. Po odseparovaní vidíme jednotlivé fragmenty ako pružky (ang. bands). Intenzita pružkov je priamo úmerná množstvu prítomnej RNA. (Biopedia © 2020)

Postup

Na predvážkach si navážime 1,6 g agarózy. Agarózu nasypeme do Erlenmayerovej banky a pridáme 100 ml 0,5x TBE pufru a premiešame. Rozpúšťame v mikrovlnnej rúre po dobu 2 minút. Horúcu agarózu schladíme pod studenou vodou a pridáme 1µl SYBR Safe

DNA Stain. Gél nalejeme do vaničky a necháme stuhnúť cca 20 min. (synlab czech s.r.o. 2019d)

Do 1. elektroforetickej jamky naniesieme 10 μ l markeru molekulovej hmotnosti (Quick-Load 100bp DNA Ladder). Ku vzorke a NK pridáme 2 μ l Loading Dye a celý objem naniesieme do ďalších jamiek. Elektroforézu nastavíme na 125V po dobu 30 minút. Po separácii si pozrieme výsledok rozdelenia fragmentov pod UV svetlom (Obr. č. 7, 8). Fragmenty vyrežeme skalpelom a vložíme do čistej 1,5 ml skúmavky a pridáme 450 μ l QG pufru (súčasť QIAquick Gel Extraction Kit). (synlab czech s.r.o. 2019d)



Obrázok 7. Rozdelenie fragmentov na agarózovom géle(vľavo), Obrázok 8. Quick-Load-rozdelenie báz (vpravo). (Zdroj: vlastný)

Veľkosť PCR produktov:

HCV g01 - 688bp

HCV g03 - 241bp

Nasleduje purifikácia PCR produktov pomocou QIAQuick Gel Extraction Kit. (synlab czech s.r.o. 2019d)

4.4.2 Purifikácia PCR produktov

Fragmenty, ktoré sme vyrezali z gélu rozpúšťame v 450 μ l QG pufru. Pre urýchlenie zahrievame na 50°C v termobloku. Po rozpustení pridáme 150 μ l isopropanolu a premiešame prevrátením skúmavky. Objem preniesieme na kolónu a centrifugujeme 1 min. pri 12 500rpm, zbernú skúmavku vyhodíme. Pridáme 700 μ l PE pufru, centrifugujeme 1 min a zbernú skúmavku vyhodíme. Znovu pridáme 700 μ l PE pufru, centrifugujeme 1 min a zbernú skúmavku vyhodíme. Centrifugujeme 1 min nasucho aby sa vysušila membrána a kolónku preniesieme do čistej 1,5 ml skúmavky. Podľa množstva izolovaného fragmentu pridáme vhodné množstvo EB pufru (20 – 50 μ l) a inkubujeme po dobu 1 minúty. Centrifugujeme 1 min, kolónku vyhodíme a purifikát je pripravený na sekvenačnú reakciu. (zdroj synlab czech s.r.o. 2019e)

4.4.3 Sekvenačná reakcia

Do čistej 1,5 ml skúmavky si pripravíme mix pre sekvenačnú reakciu. Rozpis pre jednu vzorku (synlab czech s.r.o. 2019b):

BigDye Terminator 3:1	3 μ l
Molzym H2O	3 μ l
Sekvenačný primer HCV-3 (HCV-1)	1 μ l

Mix rozpipetujeme do 200 μ l skúmaviek a pridáme 3 μ l purifikátu. Jemne zvortexujeme, stočíme a pustíme na thermocycler na príslušný profil (synlab czech s.r.o. 2019b):

94°C	5 min
35x	94°C 20 s
	53°C 30 s
	60°C 4 min
8°C	∞

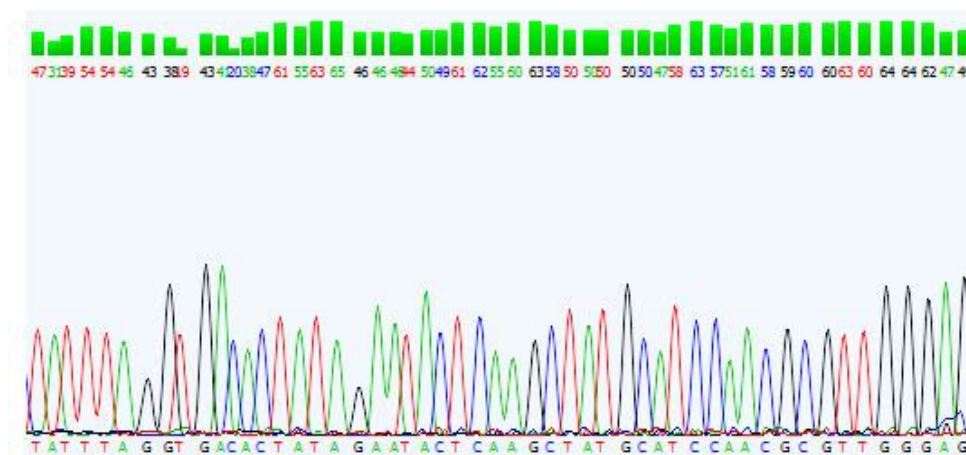
Po skončení programu nasleduje zrážanie sekvencií, nazývané aj prečisťovanie sekvencií. (synlab czech s.r.o. 2019b)

4.4.4 Zrážanie sekvencií

Do skúmaviek pridáme 45 μ l SAM Solution a 10 μ l XTerminator Solution. Skúmavky vortexujeme po dobu 30 minút a následne stočíme. XTerminator Solution sa nám po stočení usadí v skúmavke dole a supernatant (vzorka) ostane hore. Následne si prichystáme 1,5 ml skúmavku a pipetujeme 25 μ l SAM Solution a 5 μ l supernatantu. Takto prichystané vzorky sú pripravené do sekvenátora. (Príloha č. 4) (synlab czech s.r.o. 2019b)

4.4.5 Sekvenovanie

Pod pojmom sekvenovanie RNA rozumieme určenie poradia jednotlivých nukleotidov v reťazci RNA. Dnes reakcia prebieha v automatických sekvenátoroch, kde sa detekuje fluorescencia po excitácii laserovým žiarením a následne sa zosníma emitované žiarenie kamerou a spracováva sa do elektroforetogramu. (Beránek, 2016) Ako môžeme vidieť na obrázku (obr. č. 9) pre lepšiu prehľadnosť sa používa fluorescenčné značenie pre znázornenie rozdielnych nukleotidov.



Obrázok 9. Elektroforetogram. (Zdroj: Biopedia © 2020)

Na sekvenačnej doštičke si označíme pozície, kde sme vzorky pipetovali a zapíšeme to aj v počítači. Zvolíme vhodný program a pustíme. Sekvenačný program je dlhý 40 minút. Po skončení si stiahneme výsledky a hľadáme zhodu v databáze. (Obr. č. 10) Po úspešnej zhode doktori vydajú patričný výsledok.

```

1 acctgcctct tacgaggcga cactccacca tggatcactc cctgtgagg aacttctgtc
61 ttcacgggga aagcgcctag ccattggcgtt agtacgagtg tcgtgcagcc tccaggaccc
121 cccctccogg gagagccata gtgggtctgcg gaacogggtga gtacacggga atcgctgggg
181 tgaccggggtc ctttcttggg gcaaccocgct caatacccag aaatttgggc gtgcccccg
241 gagatcacta gccgagtagt gttgggtcgc gaaaggcctt gtggtaactg ctgatagggt
301 gcttgcgagt gccccgggag gtctcgtaga cctgcaaca tgagcacact tcctaaacct
361 caaagaaaaa ccaaaagaaa caccatccgt cccccacagg acgtcaagtt cccgggtggc
421 ggacagatcg ttggtggagt atacgtgttg ccgcccaggg gccacagatt ggggtgtcgc
481 gcgacgggta aaacttctga acggtcacag cctcggggac gacgacagcc tatccccaa
541 gcgctgctga gcgaaggccg gtcctgggct cagccccggg acccttggcc cctctatggt
601 aacgagggct ggggtgggc aggggtggctc ctgtccccac ggggtccccg tccatcctgg
661 ggcccaaatg accccggcg gaggtcccgc aatttgggta aagtcacga taccctaac
721 tgcggattcg ccgacctcat ggggtacatc ccgctcgtcg gcgctcctgt aggaggcgtc
781 gcaagagccc tcgctcatgg cgtgagggcc cttgaagacg ggataaattt cgcaacaggg
841 aacttggccc gttgctcctt ttctatcttc cttcttgcctc tgttctcttg ctttaattcat
901 ccagcagcca gtctagagtg gcggaatacg tctggcctct acgtccttac caacgactgt
961 tccaatagca gtattgtgta tgaggccgat gatgtcattc tgcacacacc cggctgtgta
1021 ccttgtgtcc aggacggcaa tacatctacg tgctggaccc cagtgcacacc tacagtggca
1081 gtcaggtagc tcggagcaac tactgcttcg atacgcagtc atgtggacct attagtaggc
1141 gcggccaacga tgtgctctgc gctctacgtg ggtgatatgt gtggggctgt ctttctcgtg
1201 ggacaagcct tcacgttcag acctcgacgc catcaaacgg tccagacctg taactgctcg
1261 ctgtaccag gccatctttc aggacatcga atggcttggg atatgatgat gaattggctc
1321 cccgctgtgg gtatggtggt ggcgcatgct ctgcgtttac cccagacctt gttcgacata

```

Obrázok 10. Náhl'ad poradia nukleotidov HCV genotypu 3 (Zdroj: NCBI)

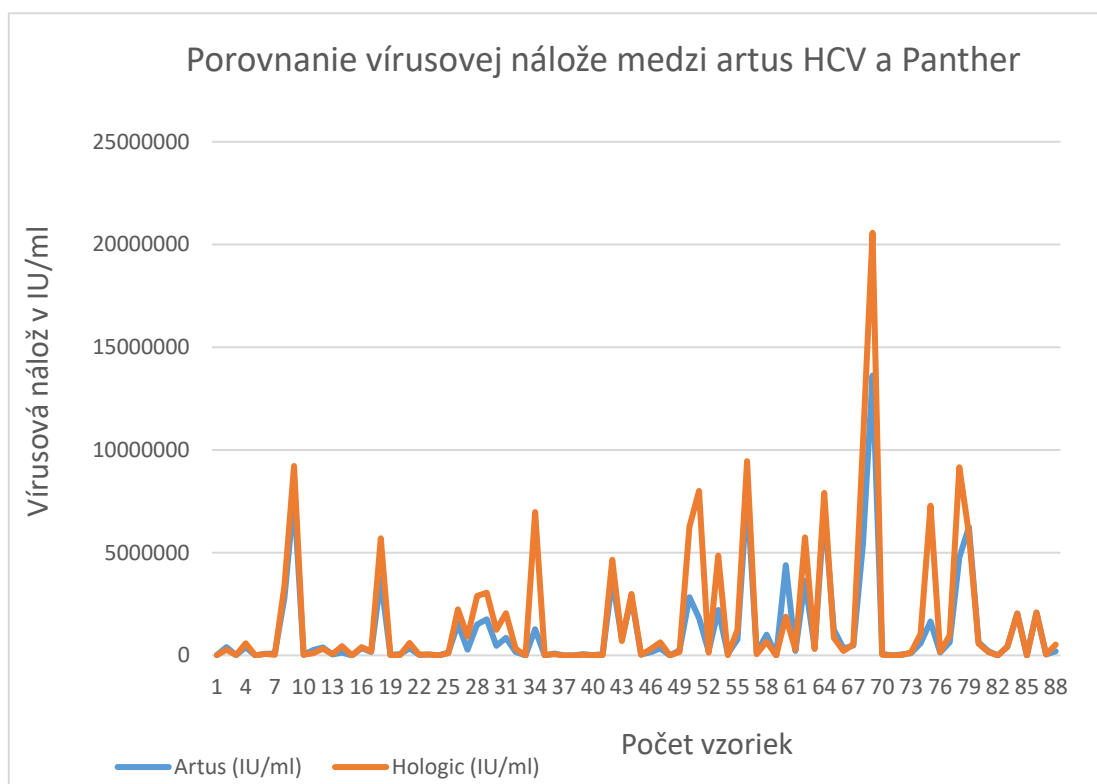
5. Výsledky

V tejto práci som sledovala celkovo 15 386 pacientov, ktorí boli vyšetrení na HCV RNA za obdobie od 17.10.2017 – 26.3.2020. Rok narodenia sa pohyboval v rozmedzí od r. 1928 – 1997. Všetky vyšetrenia som prevádzala v laboratóriu synlab czech s.r.o. v Prahe na oddelení molekulárnej detekcie patogénov.

Zamerala som sa aj na porovnanie izolačného procesu na prístroji QIASymphony s následnou detekciou *artus* RG RT-PCR kit (QIAGEN) a na detekciu HCV na prístroji Panther metódou TMA. Pre túto analýzu som pozorovala súbor s 305 vzorkami, ktoré boli súbežne spracované na oboch prístrojoch.

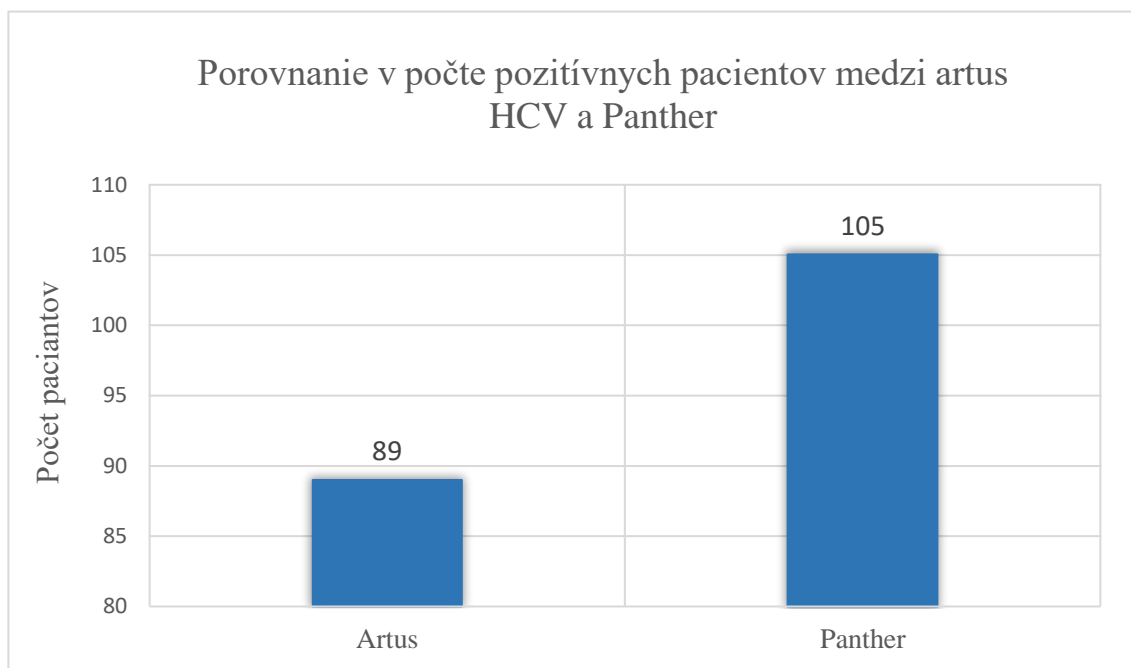
Na základe pozitivity sa následne dourčoval genotyp/subtyp metódou HCV Genotype plus Real-time PCR(SACACE), alebo sme určovali HCV genotyp/subtyp pomocou sekvenovania.

Prehľad porovnania výsledkov pozitivity medzi *artus* RG RT-PCR a Panther nám udáva obr. č. 11. Z 305 vzoriek, ktoré sme spracovali bolo 89 pozitívnych. Výsledky sa zhodujú takmer vo všetkých 89 vzorkách.



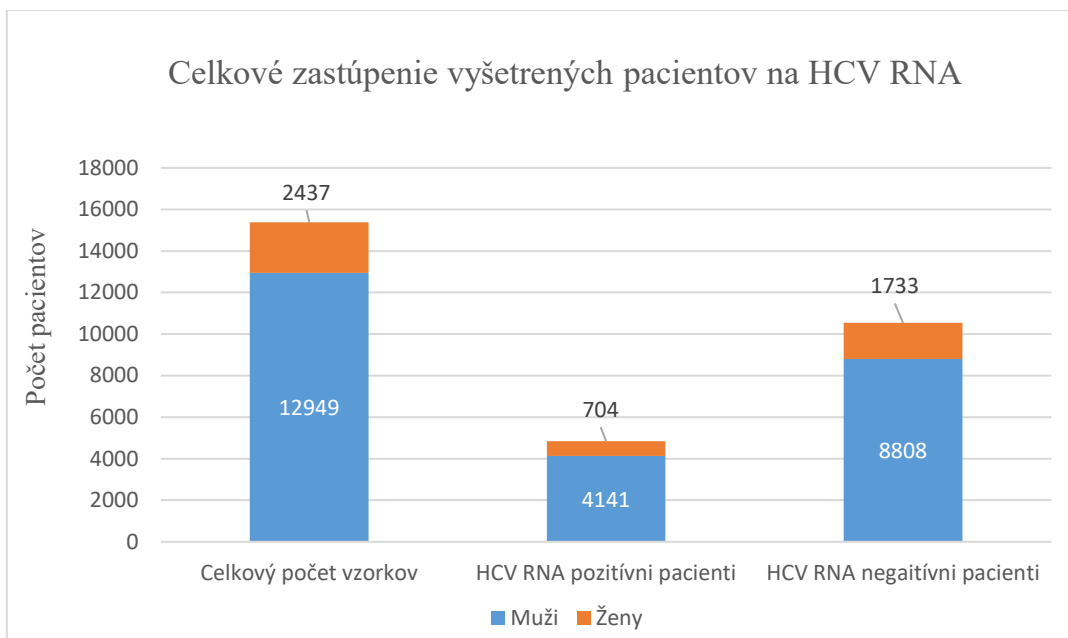
Obrázok 11. Porovnanie vírusovej nálože medzi artus HCV a Panther

Jediná odchýlka je v bode 70, kde sa hodnota líši o takmer 5 miliónov IU/ml. Panther nameral vyššiu hodnotu než artus HCV PCR. Prístroj Panther považujeme za citlivejší, pretože dokáže zachytiť aj malé množstvo vírusu, ktoré artus HCV PCR nezachytí. (Obr. č. 12)



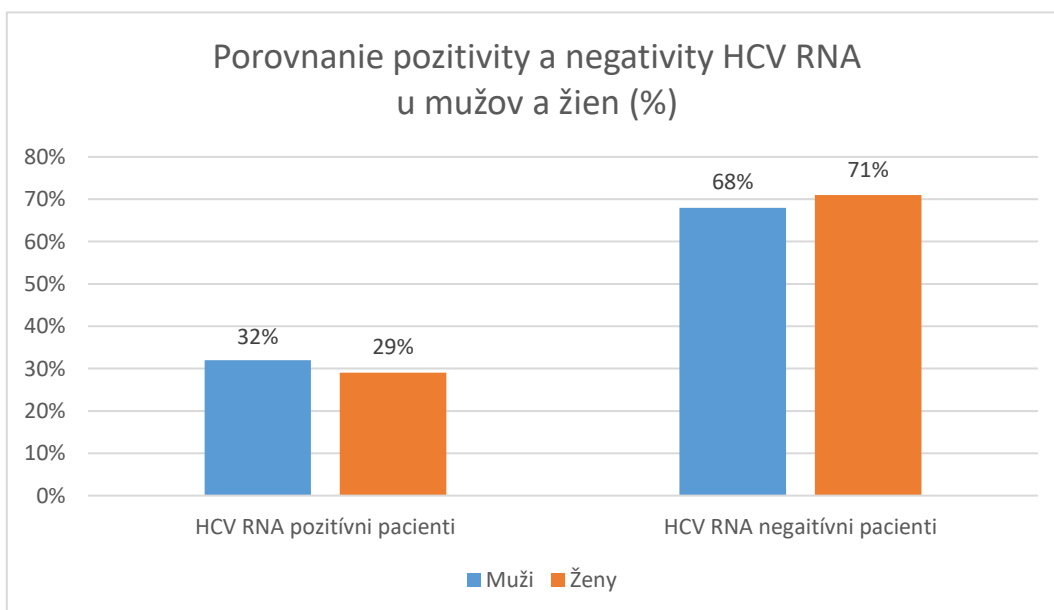
Obrázok 12. Porovnanie pozitívít medzi artus HCV a Panther

Na vyšetrenie HCV RNA bolo celkom vyšetrených 15 386 pacientov. (Obr. č. 13) Z toho 12 949 mužov a 2 437 žien. HCV RNA pozitívnych bolo 4 845, z toho 4 141 boli muži a 704 boli ženy. HCV RNA negatívnych bolo dohromady 10 541, z čoho 8 808 boli muži a 1 733 ženy.



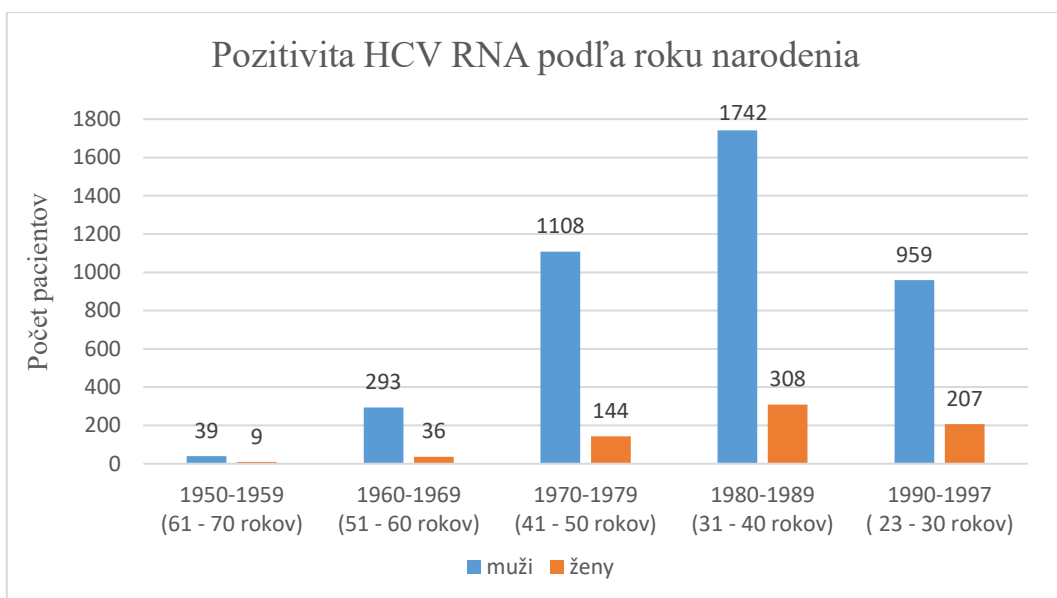
Obrázok 13. Celkové zastúpenie vyšetrení na HCV RNA.

Pre lepšie znázornenie udávam aj rozlíšenie pozitivity a negativity na HCV RNA u mužov a žien v percentách. (Obr. č. 14) Na obrázku môžeme vidieť že pozitivita u mužov je 32 % a u žien 29 %, čo je iba o 3 % nižšia. Negativita predstavuje u mužov 68 % a u žien je to 71 %. U mužov sme zistili vyššiu pozitivitu než u žien.



Obrázok 14. Porovnanie pozitivity a negativity HCV u mužov a žien

Na obr. č. 15 som zoradila pozitívnych pacientov podľa ich roku narodenia. Môžeme vidieť, že najväčšiu pozitívitu majú muži vo veku 31 – 40 rokov života, kde bolo pozitívnych 1 742 pacientov. Ženy tiež vykazujú najväčšiu pozitívitu v tom istom veku, kde bolo 308 pozitívnych prípadov. Druhú najväčšiu skupiny tvoria muži vo veku 41 - 50 rokov, kde ich bolo pozitívnych 1 108. Žien vo veku 41 – 50 rokov bolo pozitívnych 144. Počet prípadov pozitívnych na HCV RNA vo veku 23 – 30 rokov, bolo u mužov 959 prípadov a u žien 207 prípadov. Mužov vo veku 51 – 60 rokov bolo pozitívnych 293 a žien bolo 36. Najmenšiu skupinu tvoria muži aj ženy vo veku od 61 – 70 rokov, kde bolo pozitívnych 39 mužov a 9 žien na HCV RNA.



Obrázok 15. Rozdelenie pozitívnych mužov a žien podľa roku narodenia.

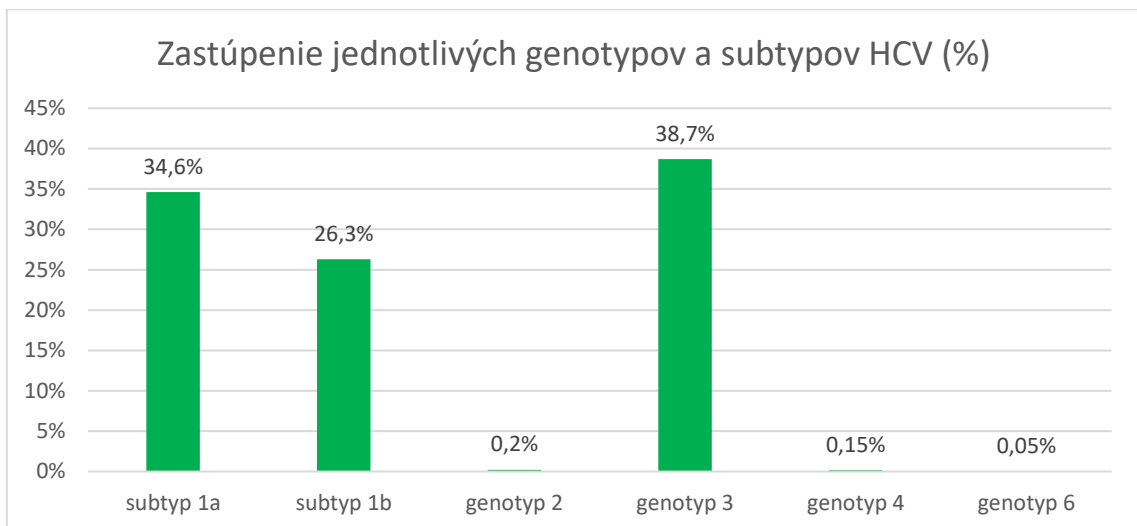
Ak bola požiadavka na dourčenie genotypu na základe pozitivity, tak bol pacientom automaticky vyšetrený aj daný genotyp/subtyp. (tabuľka č. 3) Spolu bola požiadavka dovyšetriť genotyp u 4 122 pacientov. Z toho 3 546 boli muži a 576 boli ženy.

Tabuľka 3. Dourčenie genotypu.

Dourčenie genotypu na základe pozitivity		
	muži	ženy
počet	3546	576

Po vyšetrení genotypov som zostavila graf, ktorý percentuálne znázorňuje zastúpenie jednotlivých genotypov. (Obr. č. 16)

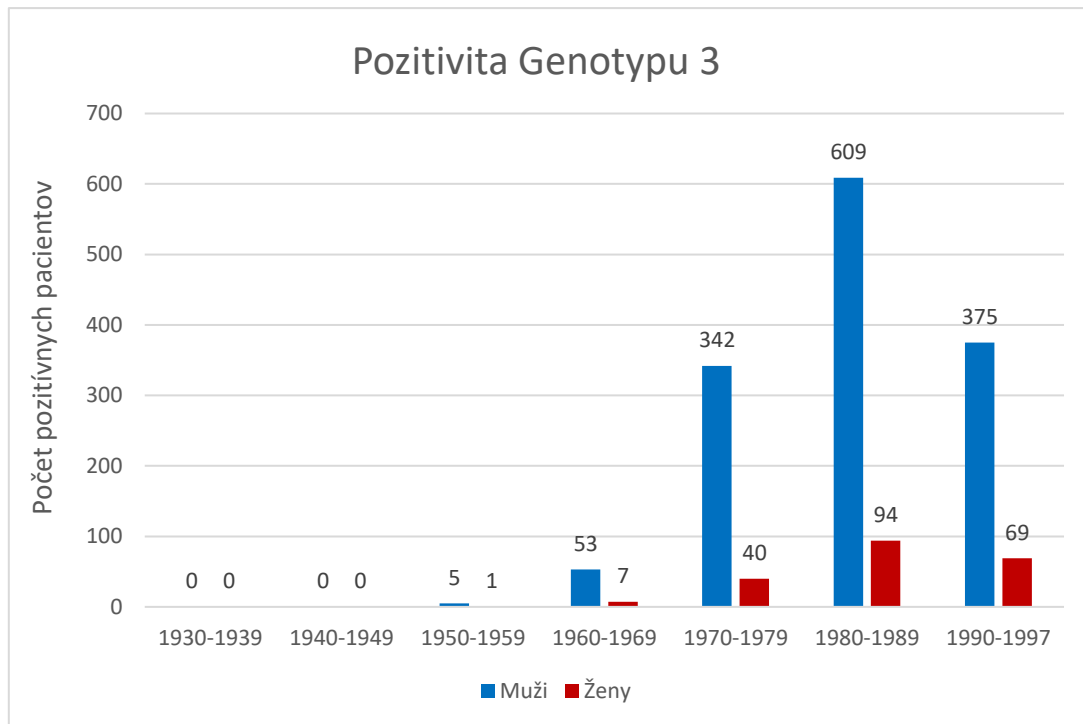
Celkovo bol najrozšírenejší genotyp 3, ktorý sa vyskytoval u 38,7 %, čo predstavuje 1 595 pacientov. Druhý najrozšírenejší bol subtyp 1a, ten sa vyskytoval u 34,6 %, čo je v prepočte 1 427 pacientov. Subtyp 1b sa vyskytoval u 26,3 %, čo predstavuje 1 083 pacientov. Genotyp 2, 4 a 6 sa u nás vyskytoval veľmi málo a to v rozmedzí od 0,05 - 0,2 %. Genotyp 2 bol preukázaný u 9 pacientov, genotyp 4 sa preukázal u 6 pacientov a genotyp 6 bol preukázaný u 2 pacientov.



Obrázok 16. Zastúpenie jednotlivých genotypov a subtypov HCV

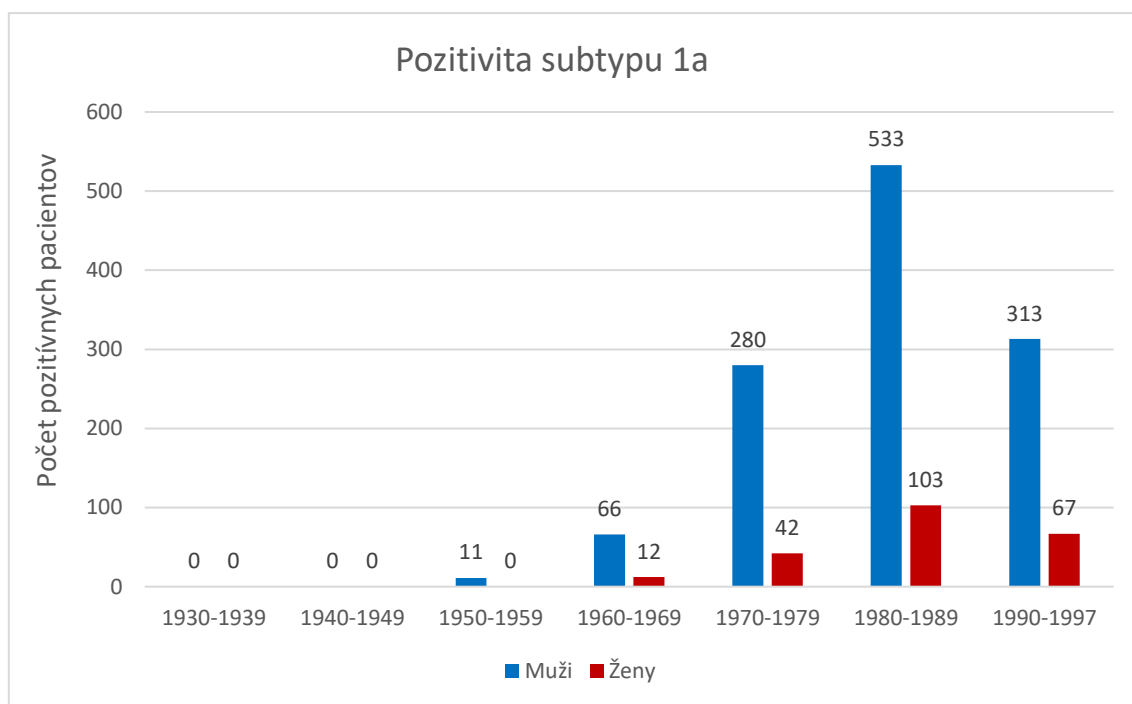
V ďalších grafoch sa detailne zaoberám jednotlivými genotypmi a subtypmi. Sledujem výskyt pozitivity genotypov a subtypov HCV podľa pohlavia a roku narodenia pacientov.

Obrázok č. 17 nám znázorňuje výskyt genotypu 3 u mužov a žien narodených od roku 1930 – 1997. Najväčšia pozitivita genotypu 3 je pacientov nar. v rokoch 1980 – 1989 a to aj u mužov aj u žien. Mužov bolo pozitívnych 609 a žien 94. V rokoch nar. 1990 – 1997 bolo mužov pozitívnych 375 a žien 69, zatiaľ čo v rokoch nar. 1970 – 1979 bolo mužov pozitívnych 342 a žien 40. V rokoch nar. 1960 – 1969 bolo pozitívnych iba 53 mužov a 7 žien. V roku nar. od 1950 – 1959 bolo iba 5 mužov pozitívnych na genotyp 3 a iba 1 žena. Od roku 1930 – 1949 sa nevyskytovala žiadna pozitivita na genotyp 3.



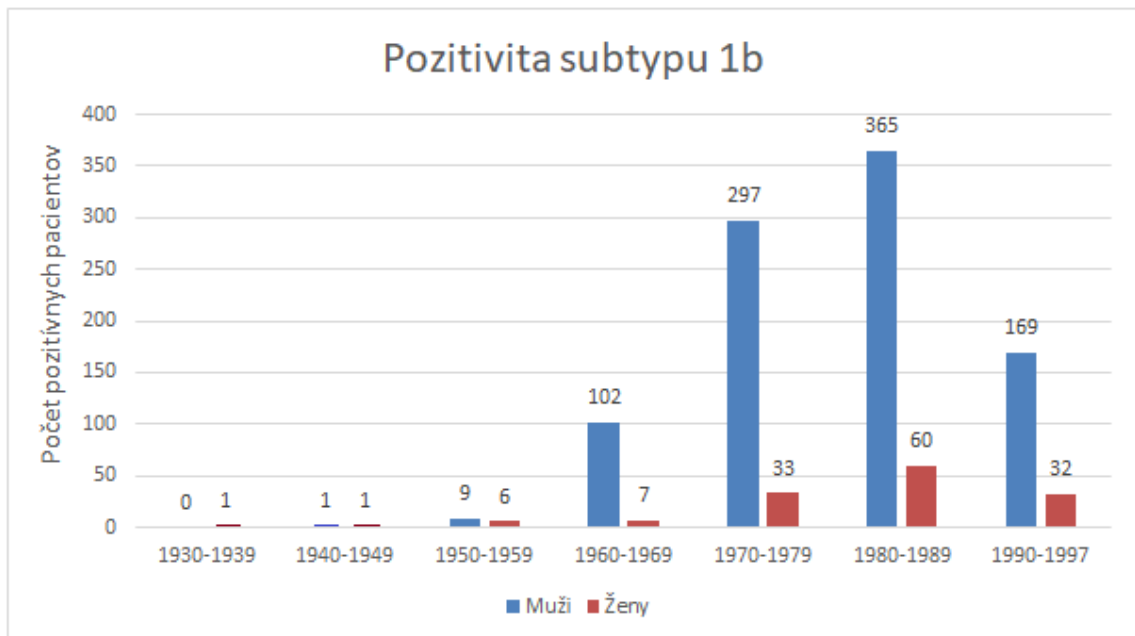
Obrázok 17. Pozitivita subtypu genotypu 3 u mužov a žien od r. nar. 1930 – 1997

Pozitivitu subtypu 1a nám znázorňuje obr. č. 18. Subtyp 1a sa vyskytuje u 1 427 pacientov. Najväčšia pozitivita je pacientov, ktorí boli narodení v roku od 1980 – 1989, kde je pozitívnych 533 mužov a 103 žien. V rokoch nar. 1990 – 1997 je pozitívnych 313 mužov a 67 žien. V roku nar. od 1970 – 1979 je pozitívnych na subtyp 1a 280 mužov a 42 žien. V rokoch nar. 1960 – 1969 pozitivita klesá u mužov aj u žien, kde je 66 pozitívnych mužov a 12 žien. Od roku nar. 1950 – 1959 je pozitívnych iba 11 mužov a 0 žien. Tak ako tomu bolo aj pri genotype 3, tak ani tu sa nevyskytuje pozitívny prípad na subtyp 1a od roku nar. 1930 – 1949.



Obrázok 18. Pozitivita subtypu 1a u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997.

Pozitivitu subtypu 1b vidíme na obr. č. 19. Subtyp 1b sa najviac vyskytuje u mužov aj žien, ktorí sa narodili v rokoch 1980 – 1989. Mužov je pozitívnych 365 a žien 60. V rokoch nar. 1970 – 1979 je pozitívnych 297 mužov a 33 žien. Od roku nar. 1990 – 1997 je pozitívnych 169 mužov a 32 žien na subtyp 1b. V rokoch nar. 1960 – 1969 je pozitívnych 102 mužov a iba 7 žien. V rokoch nar. 1950 – 1959 je 9 mužov a 6 žien pozitívnych na subtyp 1b. Od roku nar. 1930 – 1949 sú spolu pozitívny 3 pacienti. V rokoch 1930 – 1939 sa jedná o 1 ženu a v rokoch 1940 – 1949 je pozitívny 1 muž a 1 žena.



Obrázok 19. Pozitivita subtypu 1b u mužov a žien od r. nar. 1930 – 1997

Počet pozitívnych pacientov sa pri genotype 2, 4 a 6 vyskytuje zriedkavo. Najviac pozitívnych prípadov má genotyp 2. (Tabuľka č. 4) V rokoch nar. 1970 – 1979 je pozitívny 1 muž a 1 žena. V rokoch nar. 1980 – 1989 je pozitívnych 7 mužov.

Tabuľka 4. Pozitivita genotypu 2 u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997

Genotyp 2		
Počet pacientov		
Rok narodenia	Muž	Žena
1930-1939	0	0
1940-1949	0	0
1950-1959	0	0
1960-1969	0	0
1970-1979	1	1
1980-1989	7	0
1990-1997	0	0

Tabuľka 5. Pozitivita genotypu 4 u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997

Genotyp 4		
Počet pacientov		
Rok narodenia	Muž	Žena
1930-1939	0	0
1940-1949	0	0
1950-1959	1	0
1960-1969	1	0
1970-1979	1	0
1980-1989	1	0
1990-1997	2	0

Pri genotype 4 sa nevyskytuje od roku nar. 1930 – 1997 pozitívna žiadna žena. U mužov sa vyskytuje od roku nar. 1950 – 1989 pozitívny práve 1 muž v každej dekáde a od roku nar. 1990 – 1997 sa vyskytujú 2 pozitívny muži na genotyp 4. (Tabuľka č. 5)

Tabuľka 6. Pozitivita genotypu 6 u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997

Genotyp 6		
Počet pacientov		
Rok narodenia	Muž	Žena
1930-1939	0	0
1940-1949	0	0
1950-1959	0	0
1960-1969	0	0
1970-1979	1	0
1980-1989	1	0
1990-1997	0	0

Pri genotype 6 sa tiež vyskytuje pozitivita iba u 2 mužov, z toho 1 je nar. v rokoch 1970 - 1979 a druhý je nar. v rokoch 1980 – 1989. (Tabuľka č. 6)

Väčšinou určujeme daný genotyp/subtyp metódou HCV Genotype plus Real-time (SACACE). Ak je vírusová nálož nízka a je pod detekčným limitom, v takom prípade určujeme genotyp/subtyp pomocou sekvenovania genómu HCV. Na základe výsledku zo sekvenátoru, vieme jednoznačne určiť daný genotyp/subtyp. Za časové obdobie od roku 2017 – 2019 sme sekvenačne potvrdili 41 výsledkov. (Tabuľka č. 7)

Tabuľka 7. Prehľad sekvenačne potvrdených výsledkov

sekvenačne potvrdený výsledok	počet prípadov
genotyp 3	14
subtyp 1a	19
genotyp 4	2
subtyp 1b	6

Z tabuľky môžeme vidieť, že najčastejšie sme sekvenačne potvrdili subtyp 1a, a to u 19 pacientov. Genotyp 3 bol potvrdení u 14 pacientov.

6. Diskusia

Cieľom tejto práce bolo opísať dve metódy na zistenie pozitivity HCV RNA. Izolácia prebiehala na prístroji QIASymphony a detekcia kitom artus HCV RG RT-PCR. Súbežne sme taktiež spracovali vzorky na prístroji Panther metódou TMA. Panther si nevyžaduje náročnú manipuláciu so vzorkami ako je tomu pri QIASymphony. Proces prípravy sa preto podstatne skrúti a zabráni sa tak nožnej kontaminácii. V tejto časti výskumu som mala k dispozícii 305 vzoriek. Výsledky som spracovala do grafov, kde môžeme vidieť, že prístroj Panther je citlivejší. Detegoval nie len vyššie hodnoty, ale aj nízke. Zistili sme, že pri 16 pacientov zachytil aj minimálne množstvo prítomného vírusu, zatiaľ čo metóda artus HCV RG RT-PCR ich označila ako negatívnych. Panther dokáže zachytiť aj vírusovú nálož ktorá je <10 IU/ml, čo znamená, že HCV RNA je detegovaná, ale pod dolným limitom kvantifikácie. Dolný limit kvantifikácie je 9 IU/ml. Z tohto dôvodu považujem metódu TMA za citlivejšiu a presnejšiu.

V ďalšej časti som zisťovala výskyt HCV RNA u mužov a žien na základe ich veku. Pri pozitivite som dourčovala príslušný genotyp/subtyp metódou HCV genotype plus Real-time (SACACE). Ak sa nám nepodarilo dourčiť genotyp pomocou tejto metódy, tak sme dourčovali genotyp/subtyp HCV pomocou sekvenovania. V tejto časti práce som mala k dispozícii 15 386 vzoriek, za časové obdobie od 17.10.2017 – 26.3.2020. Pozitivita HCV RNA u mužov bola 32 %, čo je o 3% viac ako pozitivita žien. Ak si rozdelíme mužov a ženy podľa veku zistíme, že najviac pozitívnych mužov aj žien je vo veku 31 – 40 rokov. Druhú najväčšiu pozitivitu majú muži vo veku od 41 – 50 rokov a ženy vo veku od 23 – 30 rokov. Pozitivita HCV RNA nezáleží na pohlaví. V skupine vo veku 31 – 40 rokov sú pozitívny ako muži tak aj ženy. Genotyp, ktorý sa najčastejšie vyskytoval je genotyp 3, aj keď predpokladaný výskyt pre Českú republiku bol subtyp 1b (Husa, 2005). Hneď za genotypom 3 sa najčastejšie vyskytoval subtyp 1a a nakoniec subtyp 1b. Genotyp 3 mal najväčšiu pozitivitu u mužov aj žien vo vekovej kategórii od 31 – 40 rokov. Rovnako tomu bolo aj pri subtype 1b a subtype 1a. Genotypy 2, 4 a 6 mali malé zastúpenie. Genotyp 6 sa u nás vyskytol iba u 2 pacientov, ale tieto genotypy sa v našich podmienkach často nevyskytujú. Jednalo sa o vzorky cudzincov, ktorý sem pricestovali. Elektroforézou a sekvenovaním genómu HCV sme potvrdili výsledok u 41 prípadov.

7. Záver

V teoretickej časti tejto práce som sa zamerala na celosvetový výskyt HCV a snažila som sa upozorniť na vysoké percentuálne zastúpenie tohto ochorenia. Opísala som ako dochádza k prenosu infekcie a ako sa tomu dá zabrániť. V závere tejto časti som sa zaoberala molekulárnou štruktúrou vírusu pre lepšie pochopenie jeho správania a možnosti detekcie.

V praktickej časti som sa venovala dvom metódam na detekciu HCV RNA. Tieto metódy sú zrovnateľné, avšak Panther preukázal vyššiu citlivosť pri záchyť nízkej vírusovej nálože. Pri výsledku pozitivity je podstatné dourčiť genotyp, pretože vedomosť lekára o prítomnosti daného genotypu je kľúčová pri nastavení a postupe liečby. Pri dourčení genotypu som sa zamerala na molekulárne metódy, akými sú Real-time PCR alebo sekvenovanie genómu HCV. Genotyp, ktorý sa v mojej práci najviac vyskytoval je genotyp 3. Pozitivita genotypu 3 sa najviac potvrdila u pacientov vo veku 31 – 40 rokov. Táto štúdia skúma pacientov z väzníc a bývalých narkomanov, preto pozitivita genotypu 3 odpovedá aktuálnemu výskytu medzi narkomanmi. (Lexová, 2016)

8. Literatúra

1. ASSELAH, A. a kol., 2018. Eliminating hepatitis C within low-income countries – The need to cure genotypes 4, 5, 6. [online]. *J Hepatol.* Roč.68, č.4, s. 814–826. [cit. 2020-04-10]. doi:10.1016/j.jhep.2017.11.037
2. BERÁNEK, M., 2016. Molekulární genetika pro bioanalytiku. Karolínium. 196 s. ISBN: 978-80-246-3224-7
3. Biopedia © 2020. [online]. Elektroforéza nukleových kyselín. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/elektroforeza-nukleovych-kyselin>
4. Biopedia © 2020. [online]. Kvantitatívna PCR (Real-time PCR). [cit. 2020-02-29]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/kvantitativna-pcr-real-time-pcr>
5. FAISAL, N. a kol., 2015. An overview on hepatitis C virus genotypes and its control. [online]. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* Roč. 16, č. 4, s. 291-298. [cit. 2020-04-20]. doi.org/10.1016/j.ejmhg.2015.05.003
6. FIALOVÁ, K., © 2019 Roche Czech Republic [online]. Virová hepatitída C . [cit. 2019-12-20]. Dostupné z: <https://www.mojemedicina.cz/pruvodce-pacienta/diagnozy/hepatitidy/virova-hepatitida-c.html>
7. GOWER, E. a kol., 2014. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. [online]. *J Hepatol.* Roč. 61. [cit. 2020-04-3]. DOI:10.1016/j.jhep.2014.07.027
8. Grifols Diagnostic Solutions Inc., © 2019 Transcription-Mediated Amplification (TMA) technology simplifies NAT and speeds workflow, [online]. [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <https://www.grifols.com/en/web/procleix/tma-technology>
9. Hepatitis C Trust ©2020. Genotypes of hepatitis C [online]. [cit. 2020-04-8]. Dostupné z: <http://www.hepctrust.org.uk/information/about-hepatitis-c-virus/genotypes-hepatitis-c>
10. HOFMANN, WP. a kol., 2005. Comparison of transcription mediated amplification (TMA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. [online] *J Clin Virol.* Roč. 32, č. 4, s. 289-293. [cit. 2020-03-10]. doi: 10.1016/j.jcv.2004.08.011
11. Hologic © 2001-2017. PANTHER System Operator’s Manual (návod k obsluze systému PANTHER). [PDF]. číslo dílu: 902735CS-IFU-MN. Revize A.

12. Hologic, Inc., © 2018. Aptima HCV Quant Dx Assay. [online]. AW-14498 Rev. 0022018-10. [cit. 2020-03-18]. Dostupné z:
https://www.hologic.com/sites/default/files/2019-03/AW-14498_002_01_0.pdf
13. HUSA, P., 2005. Virové hepatitidy. 1. vyd. Praha: Galén, 247s. ISBN 80-246-04523.
14. HUSA, P., 2009. *Klin Farmakol Farm*, [online]. Roč. 23, č. 1, s. 30–34. [cit. 2020-02-14]. Dostupné z:
<https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2009/01/06.pdf>
15. CHEN, S.L., MORGAN, T.R., 2006. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. [online]. *Int J Med Sci*. Roč. 3, s. 47-52. [cit. 2020-02-22]. doi: 10.7150/ijms.3.47
16. KOČÁREK, E., 2007. Molekulární biologie v medicíně, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN: 978-80-7013-450-4, 218str.
17. KREKULOVÁ, L. a kol., 2002. Virové hepatitidy: prevence, diganostika a léčba, Praha: Triton. ISBN:80-7254-218-4, 167str.
18. LAB GUIDE, průvodce laboratoří. © 2014 - 2019. [online]. Taq-man sondy. [cit. 2020-02-29]. Dostupné z: <https://labguide.cz/taqman-sondy/>
19. LEXOVÁ, P. a kol., 2016. Výskyt virových hepatitid v České republice – rok 2015 a trendy v posledních deseti letech, [online]. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 25(6-7), s.225–230. [cit. 2020-03-28]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Hepatitidy/2015_trendy_vir_hep_v_C_R.pdf
20. MeDitorial © 2020. [online]. Genotypy viru hepatitidy C. ISSN 1803-5477. Dostupné z: <https://www.virova-hepatitida.cz/aktualne-pro-odborniky/genotypy-viru-hepatitidy-c-1304>
21. NCBI, Hepatitis C virus genotype 3, genome. referečné číslo: NC_009824.1
22. QIAGEN, © 2010–2015. Návod k použití sady QIASymphony® DSP Virus/Pathogen (příručka). [Online, PDF]. [cit. 2020-02-28].
23. QIAGEN, © 2012. [online]. Příručka k soupravám QIASymphony® DSP DNA. [cit. 2020-02-20]. Dostupné z:
https://www.dynex.cz/data/machines/937236_qiasymphony_dsp_dna_cz.pdf
24. QIAGEN, © 2015. [online]. Příručka pro sadu artusHCV RG RT-PCR. [cit. 2020-03-10]. Dostupné z:

https://www.dynex.cz/data/machines/45182634518265_artus_hcv_rg_rtPCR_ce_0315_row_cz.pdf

25. SACACE™, 2015. HCV Genotype Plus Real-TM .[příručka].
26. SHIN, E., SUNG, P., PARK, S., 2016. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. [online]. *Nat Rev Immunol*. Roč. 16, s. 509–523. [cit. 2020-02-19]. doi.org/10.1038/nri.2016.69
27. SLABÝ, O., 2015. Molekulární medicína. Praha: Galén. 598s. ISBN: 978-80-7492-121-6
28. SOUČEK, M., ŠPINAR, J., VORLÍČEK, J., SVAČINA, P., 2011. Vnitřní lékařství 1. díl, Brno: Grada, 805s. ISBN 978-80-210-5418-9.
29. SOUČEK, M., ŠPINAR, J., VORLÍČEK, J., SVAČINA, P., 2011. Vnitřní lékařství 2. díl, Brno: Grada, ISBN 978-80-210-5418-9, str. 1224
30. SYNLAB CZECH s.r.o., 2019a. PI.PCE/MLP 23 – interný dokument. Artus HCV RG RT-PCR (QIAGEN)
31. SYNLAB CZECH s.r.o. 2019b. PI.PCE/MLP 31 – interný dokument. Sekvenace
32. SYNLAB CZECH s.r.o. 2019c. PI.PCE/MLP 32 – interný dokument. HCV genotypizace
33. SYNLAB CZECH s.r.o. 2019d. PI.PCE/MLP 28 – interný dokument. Příprava agarózového gelu a separace fragmentů
34. SYNLAB CZECH s.r.o. 2019e. PI/PCE/MLP 29 – interný dokument. Purifikace PCR produktů z agarózového gelu.
35. ŠIMEK, P., 2012. *ZSF-JU_Základy instrumentální analýzy*. České Budějovice.
36. ŠPIČÁK, J. a kol., 2017. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii II*, Praha: Grada, 320s. ISBN: 978-80-271-0318-8.
37. URBÁNEK, P., 2017. *Hepatitida C*. 1. vydání. Praha: Mladá fronta. 359 s. ISBN: 978-80-204-4410-3
38. URBÁNEK, P., 2019. Virová hepatitida typu C. [online]. *Medicína po promoci*. [cit. 2020-02-20]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/44904-virova-hepatitida-typu-c>
39. URBÁNEK, P., HUSA, P. a kol., 2014. Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV), [online]. [cit. 2020-03-20]. Dostupné z: <https://www.infekce.cz/DoporVHC14.htm>

40. ZEIN, N, N., 2000. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. [online].
Clin Microbiol Rev. Roč. 13, č. 2, s. 223–235. [cit. 2020-04-8].
DOI:10.1128/cmr.13.2.223-235.2000

9. Zoznam obrázkov

9.1 Zoznam obrázkov

- Obrázok 1. Priebeh HCV infekcie (Upravené podľa: Chen, Morgan, 2006).
- Obrázok 2. Oblasti genómu hepatitídy C. (Zdroj: Urbánek, 2017)
- Obrázok 3. Priebeh izolácie vzorku. (Zdroj: QIAGEN, © 2012)
- Obrázok 4. Výsledok HCV RNA z Rotor-Gene Q (Zdroj: vlastný)
- Obrázok 5. Reagencie a kalibrátory. (Zdroj: vlastný)
- Obrázok 6. Analýza s hybridizačnými sondami. (Zdroj: Hologic © 2001-2017)
- Obrázok 7. Rozdelenie fragmentov na agarózovom géle(vľavo)
- Obrázok 8. Quick-Load-rozdelenie báz (vpravo). (Zdroj: vlastný)
- Obrázok 9. Elektroforetogram. (Zdroj: Biopedia © 2020)
- Obrázok 10. Náhľad poradia nukleotidov HCV genotypu 3 (Zdroj: NCBI)
- Obrázok 11. Porovnanie vírusovej náložky medzi artus HCV a Panther
- Obrázok 12. Porovnanie pozitívít medzi artus HCV a Panther
- Obrázok 13. Celkové zastúpenie vyšetrení na HCV RNA.
- Obrázok 14. Porovnanie pozitivity a negativity HCV u mužov a žien
- Obrázok 15. Rozdelenie pozitívnych mužov a žien podľa roku narodenia.
- Obrázok 16. Zastúpenie jednotlivých genotypov a subtypov HCV
- Obrázok 17. Pozitivita subtypu genotypu 3 u mužov a žien od r. nar. 1930 – 1997
- Obrázok 18. Pozitivita subtypu 1a u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997.
- Obrázok 19. Pozitivita subtypu 1b u mužov a žien od r. nar. 1930 – 1997

9.2 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1. Vyhodnotenie HCV RNA

Tabuľka 2. Vyhodnotenie HCV Genotype plus Real-RM

Tabuľka 3. Dourčenie genotypu.

Tabuľka 4. Pozitivita genotypu 2 u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997

Tabuľka 5. Pozitivita genotypu 4 u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997

Tabuľka 6. Pozitivita genotypu 6 u mužov a žien od r. nar. 1930 - 1997

Tabuľka 7. Prehľad sekvenačne potvrdených výsledkov

10. Zoznam skratiek

HCV – vírus hepatitídy C

HIV – vírus imunitnej nedostatočnosti (human immunodeficiency virus)

HCC – hepatocelulárny karcinóm

DAA – priamo pôsobiace virostatiká (directly acting antivirals)

NTR – neprekladné oblasti genómu HCV (nontranslated regions)

PCR – polymerázová reťazová reakcia

Real-TM PCR - polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase

RdRp – RNA depedentná RNA-polymeráza

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

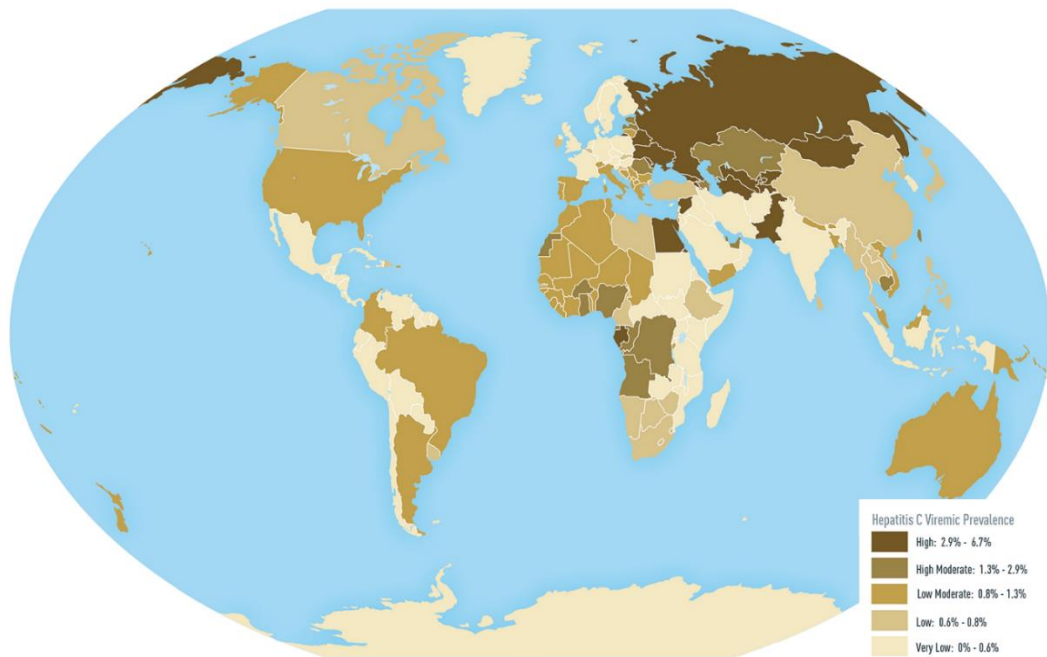
TMA – transkripčne sprostredkovaná amplifikácia

EDTA – odobraná nezrážanlivá krv (kyselina etylén-diamino-tetraoctová)

NK – negatívna kontrola

11. Prílohy

Príloha 1: obr.1: prevalencia HCV infekcie vo svete



Zdroj: Gower E a kol., J Hepatol. 2014 Nov, roč. 61, DOI:10.1016/j.jhep.2014.07.027

Príloha 2: obr. 2: Izolačný prístroj QIASymphony



(Zdroj: vlastný)

Príloha 3: obr. 3: Prístroj Panther



(Zdroj: vlastný)

Príloha 4 : obr. 4: Sekvenátor 3500 Genetic Analyzer



(Zdroj: vlastný)