

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

**Molekulární diagnostika virové hepatitidy C – osobní
zkušenosti z rutinní laboratoře**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Školitel externista: MUDr. Miluše Kreidlová

Hradec Králové, 2012

Veronika Horáčková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

datum

podpis

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy za vedení bakalářské práce a MUDr. Miluši Kreidlové ze sérologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za odbornou konzultaci, pomoc při statistickém zpracování a za velkou podporu během mého studia.

Další poděkování patří Mgr. Lindě Matoušové ze sérologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za cenné rady a čas věnovaný mé práci.

Také bych ráda poděkovala svým kolegyním ze sérologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, které mi ochotně pomáhaly po celou dobu mého studia.

V neposlední řadě patří velký dík mému příteli a rodině za trpělivost, pomoc a dlouhodobou podporu při studiu.

SOUHRN

Autor: Veronika Horáčková

Název: Molekulární diagnostika virové hepatitidy C – osobní zkušenosti z rutinní laboratoře

Bakalářská práce

Studijní obor: Zdravotní laborant, kombinovaná forma

Cíl práce: Přiblížení problematiky virové hepatitidy C se zaměřením na její laboratorní diagnostiku. Statistické zpracování výsledků genotypizace viru hepatitidy C.

Materiál a metody: V období od 1.7.2005 do 30.6.2012 byla na úseku molekulárně biologické diagnostiky sérologické laboratoře ÚLBLD VFN a 1. LF UK v Praze metodou reverzní hybridizace provedena genotypová analýza viru hepatitidy C u 2 185 vzorků. Výsledky testování byly statisticky zpracovány.

Výsledky: Z 2 185 vzorků bylo 1 372 (62,8 %) od mužů a 813 (37,2 %) od žen, průměrný věk pacientů v souboru byl 36,7 let. Většina požadavků na vyšetření HCV genotypů pocházela od specialistů z Prahy (91,0 %). Genotypová analýza prokázala nejvyšší zastoupení genotypu 1b (51,6 %), který je následován genotypem 3a (22,6 %). S narůstajícím věkem pacientů výskyt HCV genotypu 1b stoupá, u genotypu 3a je trend opačný. Četnost záchytů genotypu 3a se zvyšuje.

Závěry: Virová hepatitida C je onemocnění s možnými závažnými následky. Laboratorní diagnostika se podílí nejen na diagnostice infekce, ale podle jejích výsledků je též vedena léčba a sledována její úspěšnost. Výsledky statistického zpracování výsledků genotypové analýzy viru hepatitidy C jsou ve shodě s daty a trendy uváděnými v tuzemských i zahraničních studiích.

ABSTRACT

Author: Veronika Horáčková

Title: Molecular diagnosis of viral hepatitis C – personal experience from routine laboratory

Bachelor work

Field of study: Medical laboratory technician, combined study form

The aim of the study: Introduction to the issues concerning the viral Hepatitis C with an emphasis on the laboratory diagnostics thereof. Statistical processing of the Hepatitis C virus genotype analysis results.

Material and methods: In the period of 1 July 2005 – 30 June 2012, the Hepatitis C virus genotype analysis was performed in respect of 2 185 samples at the division of molecular biological diagnostics of the serology laboratory of the Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of the General Faculty Hospital and the First Faculty of Medicine of Charles University in Prague, using the reverse hybridization method. The testing results were statistically processed.

Results: Of the set of 2 185 samples, 1 372 (62,8 %) originated from males and 813 (37,2 %) from females, with the average age of patients included in the set being 36,7 years. The majority of requests for the HCV genotype analysis originated from specialists in Prague (91,0 %). The genotype analysis demonstrated the highest prevalence of the 1b genotype (51,6 %), followed by the 3a genotype (22,6 %). The prevalence of the 1b HCV genotype rises with increasing age of patients, with the opposite trend for the 3a genotype. The frequency of the 3a genotype detection is rising.

Conclusions: The viral Hepatitis C is a disease with potential severe consequences. The laboratory diagnostics takes part not only in diagnosing the infection, but the results of such diagnostics determine the treatment as well as the monitoring of the success rate thereof. Outcomes of the statistical processing of the Hepatitis C virus genotype analysis results correspond to the data and trends mentioned in both domestic and foreign studies.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	7
1 ÚVOD.....	9
1.1 ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 CHARAKTERISTIKA VIROVÉ HEPATITIDY TYPU C	10
2.2 VIRUS HEPATITIDY C	12
2.3 GENOTYPY VIRU HEPATITIDY C	13
2.4 PŘENOS VIROVÉ HEPATITIDY C	13
2.5 LÉČBA VIROVÉ HEPATITIDY C.....	14
2.5.1 Faktory ovlivňující léčbu chronické hepatitidy C.....	14
2.6 POLYMORFIZMUS GENU IL28B	15
2.7 SPECIFICKÁ DIAGNOSTIKA VIROVÉ HEPATITIDY C	16
2.7.1 Detekce specifických protilátek proti viru hepatitidy C	17
2.7.2 Detekce core antigenu viru hepatitidy C.....	18
2.7.3 Detekce HCV-RNA	18
2.8 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY V DIAGNOSTICE VHC.....	18
2.8.1 Stanovení virémie HCV RNA	19
2.8.2 Identifikace HCV genotypu	20
3 PROBLEMATIKA URČENÍ GENOTYPU HCV	21
3.1 IZOLACE RNA	21
3.2 REVERZNÍ TRANSKRIPCE A AMPLIFIKACE.....	22
3.3 DETEKCE PRODUKTU	22
3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	24
4 VÝSLEDKY	27
5 DISKUZE	32
6 ZÁVĚR	34
7 SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK.....	35
8 POUŽITÁ LITERATURA A PRAMENY.....	37

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

anti-HCV	protilátka proti viru hepatitidy C
cDNA	komplementární DNA (z ang. complementary DNA)
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosid-trifosfáty
E1, E2	obalové proteiny viru hepatitidy C
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová kyselina, chelační činidlo (z ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
EIA	enzymová imunoanalýza (z ang. Enzyme immunoassay)
ELISA	z ang. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HCV RNA	ribonukleová kyselina viru hepatitidy C
HCV	virus hepatitidy C
HIV	virus syndromu získané imunodeficiencie (z ang. human immunodeficiency virus)
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin třídy G
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IL28B	interleukin 28B (IFN λ 3)
IU	mezinárodní jednotka
LIA	Line Immuno Assay
NK	nukleová kyselina
NS2 – NS5	nestrukturální oblast 2 – 5 viru hepatitidy C
ORF	otevřený čtecí rámeček (z ang. open reading frame)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z ang. polymerase chain reaction)
PEG-IFN	pegylovaný interferon – α
RLU	relativní světelná jednotka (z ang. Relative Light Units)
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkripce-PCR
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z ang. single nucleotide polymorphism)
SVR	setrvalá virologická odpověď (z ang. Sustained Viral Response)
SZÚ	státní zdravotní ústav

TMA	transcription-mediated amplification
VHA	virová hepatitida A
VHB	virová hepatitida B
VHC	virová hepatitida C

1 ÚVOD

Infekce virem hepatitidy C je závažné onemocnění, ale také zajímavá problematika. Pro sepsání této bakalářské práce jsem se rozhodla proto, že zde mohu využít vlastní zkušenosti z pracoviště – úseku molekulárně biologické diagnostiky sérologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Práce má za úkol přiblížit problematiku onemocnění virovou hepatitidou C a zaměřit se na jeho laboratorní diagnostiku, zejména její molekulárně biologickou část s podrobnějším věnováním se tématice genotypů viru hepatitidy C.

1.1 Zadání bakalářské práce

Zadáním bakalářské práce je seznámit čtenáře se základní charakteristikou virové hepatitidy C, jejím přenosem, léčbou a zejména laboratorní diagnostikou. Speciální část je zaměřena na genotypovou analýzu viru hepatitidy C, zpracování a vyhodnocení výsledků, jejich interpretaci a diskuzi s využitím teoretických a praktických znalostí dané problematiky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

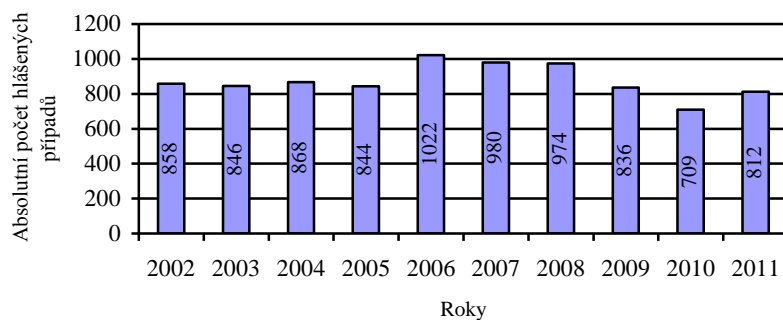
V následujících kapitolách se zaměřím na obecnou charakteristiku virové hepatitidy typu C, viru způsobujícího toto onemocnění a především na možnosti specifické diagnostiky virové hepatitidy C.

2.1 Charakteristika virové hepatitidy typu C

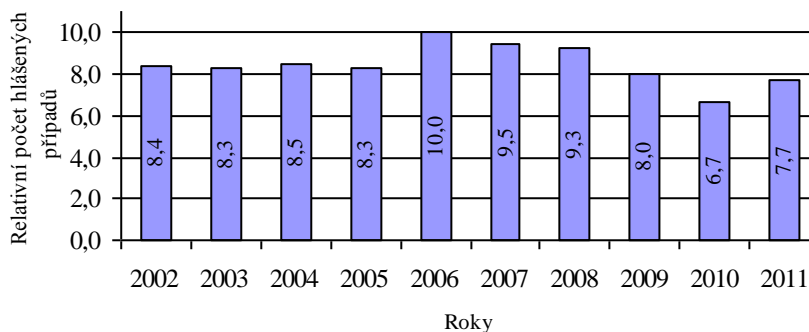
Virové hepatitidy patří mezi zánětlivá onemocnění jater. Moderní éra výzkumu po druhé světové válce rozdělila virové hepatitidy na dvě epidemiologicky a etiologicky odlišné formy onemocnění. V roce 1947 označil MacCallum hepatitidu A (VHA) jako infekční či epidemickou formu a hepatitidu B (VHB) jako sérovou formu onemocnění.

Po roce 1973 bylo prokázáno, že VHA a VHB nejsou jediné vyskytující se virové hepatitidy. Všechny ostatní hepatitidy byly na dlouhou dobu označovány jako non-A, non-B (Husa, 2005). V roce 1989 se podařilo určit, že většina posttransfuzních virových hepatitid non-A, non-B je způsobena virem hepatitidy C (HCV). Závažnost HCV infekce je v její více než 50 % tendenci k přechodu do chronicity (s následným rizikem jaterní cirhózy a hepatocelulárního karcinomu) (Průša, 2009). Poškození jater je způsobeno zřejmě kombinací přímého cytopatického účinku virových proteinů a imunitní odpovědi pacienta (Beneš, 2009). Dekompenzované jaterní onemocnění vzniklé v důsledku infekce HCV je jedním z nejčastějších důvodů pro transplantaci jater (Trunečka, 2000). Virová hepatitida C je léčbou ovlivnitelné onemocnění, ale vakcinace v současné době není dostupná (Ashfaq et al., 2011).

Virem hepatitidy C je ve světě infikováno kolem 180 milionů lidí, to je až čtyřikrát více, než je HIV pozitivních (Ashfaq et al., 2011). V České republice je odhadována prevalence infekce HCV od 0,3 do 0,5 % (Němeček, Strunecký, 2009). Počet nově zjištěných případů vybraných infekčních nemocí (včetně virové hepatitidy C) v České republice je zveřejňován na webových stránkách Státního zdravotního ústavu pomocí programu EPIDAT. V grafu 1 jsou zobrazeny počty hlášených případů VHC (virová hepatitida C) v letech 2002 – 2011. Maximální počet VHC za uvedené období byl hlášen v roce 2006, minimální v roce 2010.



Graf 1 Hlášené případy VHC (akutní i chronické) v České republice v letech 2002 – 2011 – absolutně (Epidata SZÚ, cit. 2012-04-02)

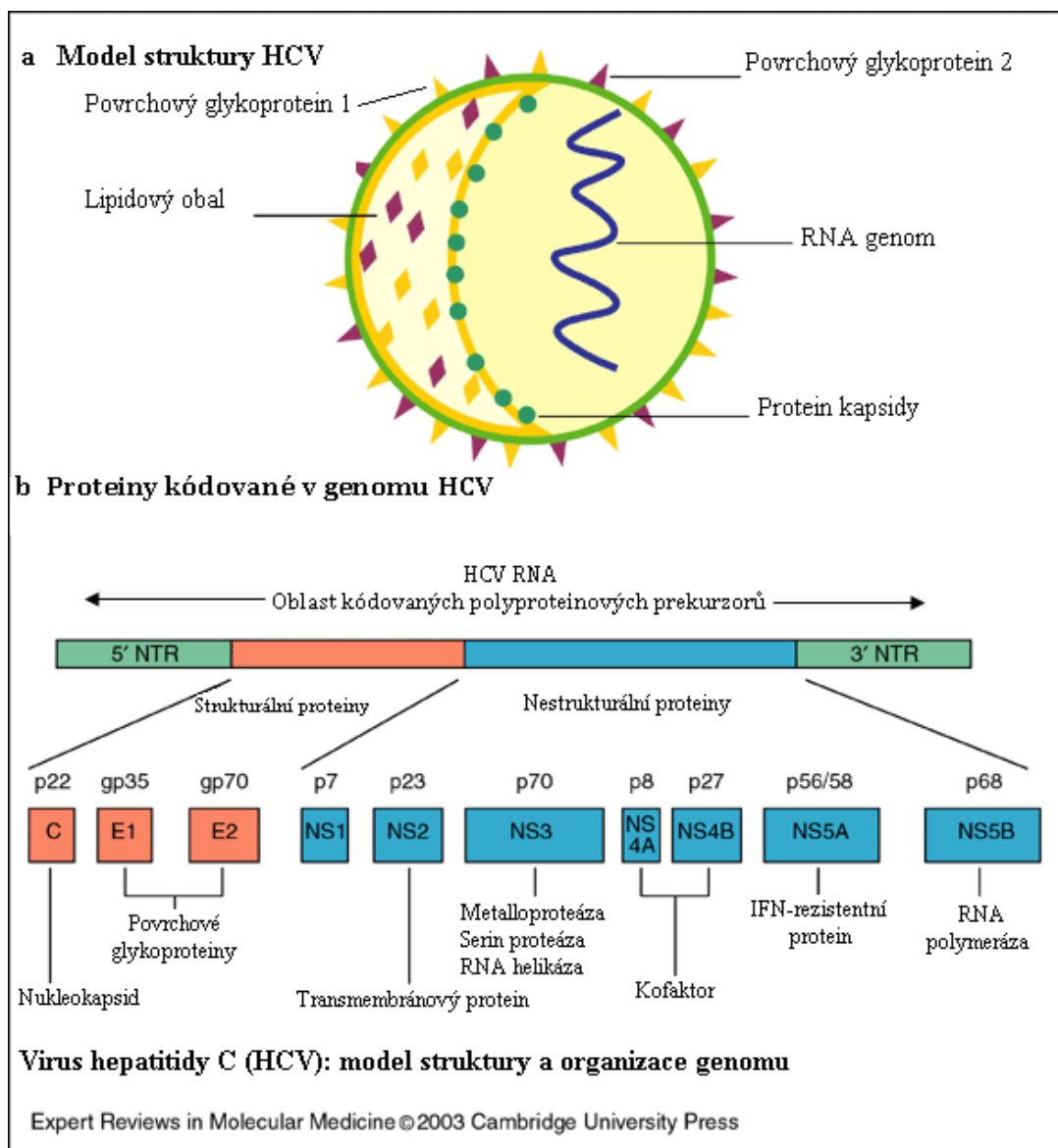


Graf 2 Hlášené případy VHC (akutní i chronické) v České republice v letech 2002 – 2011, na 100 000 obyvatel – relativně (Epidata SZÚ, cit. 2012-07-18)

Do systému EPIDAT přispívají prostřednictvím krajských hygienických stanic zdravotnická zařízení v ČR. Výpovědní hodnota výše uvedených čísel je mj. ovlivněna tím, že VHC se jako krví přenosné onemocnění nemalou měrou týká populace injekčních uživatelů drog (Mravčík, 2012), kteří se zdravotnickým institucím vyhýbají (Mravčík et al., 2009). Dále také fakt, že většina akutních VHC je klinicky němá (Krekulová a Řehák, 2002), přispívá k tomu, že skutečný počet nových případů je vyšší, než počet případů hlášených.

2.2 Virus hepatitidy C

Virus hepatitidy C (HCV) je malý obalený RNA virus patřící do čeledi Flaviviridae, jediný zástupce rodu *Hepacivirus* (Urbánek, 2005). Velikost částice je v rozmezí 30 – 60 nm. Virový genom obsahuje jednovláknovou RNA skládající se přibližně z 10 000 nukleotidů s jedním dlouhým otevřeným čtecím rámcem (open reading frame, ORF). Genetická informace uložená v genomu je překládána do polyproteinu, který je posttranslačně štěpen na jednotlivé produkty. A to na nestrukturální proteiny, jež jsou označovány NS2 – NS5, a strukturální proteiny, kam patří protein kapsidy (core - C) a povrchové glykoproteiny (E1, E2) (Husa, 2005).



Obrázek 1 Virus hepatitidy C (HCV): model struktury a organizace genomu (upraveno podle Anzola, Burgos, 2003)

2.3 Genotypy viru hepatitidy C

Virus hepatitidy C má v lidském organismu rychlý obrat, produkce se odhaduje na $10^{10} - 10^{12}$ virionů denně, poločas života virionu v séru je pouhých 2,7 hodiny. Při dlouhodobém průběhu infekce je možná velká frekvence mutací, což způsobuje značnou genetickou variabilitu HCV (Beneš, 2009). Na základě nukleotidových modifikací je HCV rozdělen do šesti genotypů (značeny 1 - 6) a více než 80 subtypů (značeny abecedně malými písmeny). Jednotlivé genotypy se mezi sebou liší v 30 – 50 % nukleotidových sekvencí a různé subtypy se liší v 15 – 30 % nukleotidových sekvencí.

Infikování jedince je zpravidla spojeno s infekcí jedním genotypem, jedním subtypem (Urbánek, 2005). V Evropě převažují genotypy 1a, 1b a 3a, v některých státech je častý též výskyt typů 2 (Itálie) a 4 (Esteban et al., 2008). Genotyp 3 se objevuje hlavně v Indii, Nepálu a Pákistánu. V Africe a na Středním východě je častější výskyt genotypu 4, genotyp 5 je běžný pro Severní Afriku a genotyp 6 se nachází v Hongkongu a Jihovýchodní Asii (Ashfaq et al., 2011).

Stanovení genotypu viru hepatitidy C má význam nejen pro epidemiologické účely, ale byla také zjištěna souvislost mezi genotypem HCV a odpovědí na léčbu virové hepatitidy C. Lépe jsou léčbou ovlivnitelné infekce způsobené genotypy 2 a 3 (Beneš, 2009).

2.4 Přenos virové hepatitidy C

Zdrojem infekce je výhradně člověk (Rožnovský, 2007). Ve fázi virémie (tj. v období přítomnosti viru v krvi) je zdrojem infekce krev nemocného s akutní i chronickou VHC (Stránský, 1999). Do roku 1992, kdy bylo na transfúzních stanicích zavedeno testování protilátek proti viru hepatitidy C, bylo nejdůležitější cestou přenosu přijetí krevního derivátu. V současné době je v popředí přenos v rámci injekční toxikomanie. Nemalý podíl na šíření infekce má též zdravotní péče (např. v souvislosti s pravidelným dialyzačním léčením, transplantací orgánů) (Urbánek, 2005). Nákaza je možná i jinými cestami jako je sexuální přenos, perinatální přenos, perkutánní přenos (tetování) aj. V domácím prostředí je možný přenos viru společným sdílením předmětů (zubního kartáčku, nůžek na nehty, apod.) kontaminovaných infikovanou krví (Stránský, 1999).

2.5 Léčba virové hepatitidy C

Léčba virové hepatitidy C je náročná (co do její délky, spolupráce s pacientem, míry vedlejších nežádoucích účinků a také ekonomicky) a patří do rukou specialisty, hepatologa či infekcionista. Je zvažována u všech pacientů s diagnostikovanou chronickou HCV infekcí (Galský et al., 2012).

Protivirová terapie má zamezit rozvoji komplikací HCV infekce. K tomu je potřeba infekci eliminovat, resp. dosáhnout tzv. SVR (setrvalé virologické odpovědi), jež je definována jako negativní sérová HCV RNA zjištěná metodou PCR (polymerázová řetězová reakce) se standardním detekčním limitem (tzn. s citlivostí alespoň 50 IU HCV RNA/ml) ve 24. týdnu po ukončení terapie (Galský et al., 2012).

Od počátku 21. století je standardem léčby chronické VHC kombinace pegylovaného interferonu- α s ribavirinem (PEG-IFN/ribavirin) (Pročke, 2011). Tato léčba je náročná vzhledem k délce jejího trvání a rozsahu vedlejších účinků. Několik let probíhá vývoj nové skupiny léků, přímo působících virostatik - inhibitorů virových proteáz. Dva z nich (boceprevir a telaprevir) byly v roce 2011 uvolněny ke klinickému použití (Galský et al., 2012). Inhibitory proteáz nemohou být podávány samostatně (virus by se rychle stal rezistentním), ale v kombinaci s PEG-IFN a ribavirinem. U této trojkombinace bylo v klinických studiích zjištěno významné zvýšení úspěšnosti léčby ve srovnání s léčbou standardní (Pročke, 2011).

2.5.1 Faktory ovlivňující léčbu chronické hepatitidy C

Ukazatele, které určují léčebnou odpověď, rozdělujeme do tří skupin. První skupinu tvoří virový genotyp a iniciální virová nálož. Druhá skupina zahrnuje faktory ovlivněné ze strany pacienta, jako je věk a pohlaví, etnický původ, stádium onemocnění jater, přítomnost nebo nepřítomnost diabetes mellitus. Třetí skupinu představuje faktor zjištěný v průběhu protivirové terapie, a sice míra poklesu virové nálože za určité časové období, podle níž je virologická odpověď na léčbu klasifikována jako rychlá, časná, pomalá nebo žádná (stav rezistence) (Moghaddam et al., 2011).

Vzhledem k prognóze úspěšnosti léčby se řadí genotypy 2 a 3 viru hepatitidy C mezi příznivé. Léčba kombinací PEG-IFN/ribavirin v případě infekce těmito typy trvá kratší dobu, a to 24 týdny, než při infekci genotypy 1, 4, 5 a 6, kdy je délka léčby standardně 48 týdnů. Pacienti infikovaní genotypem 1 dosáhnou SVR ve 40 – 50 %, zatímco u pacientů nakažených genotypy 2 a 3 je SVR dosaženo zhruba v 80 %. Také

v případě nových preparátů ze skupiny přímo působících virostatik byla zjištěna jejich rozdílná aktivita vůči různým genotypům HCV (Galský et al., 2012). Další příčinou těžšího dosažení SVR může být současná infekce (tzv. koinfekce) viru hepatitidy C s jiným virem (VHB, HIV) a vyšší virová nálož před zahájením léčby.

Mezi faktory pozitivně ovlivňující prognózu úspěšnosti terapie ze strany pacienta byly na základě pozorování zařazeny: věk nižší než 40 let, bílá a žlutá rasa, ženské pohlaví, nízký BMI (body mass index), malý stupeň poškození jater bez přítomnosti cirhózy a bez přidružených chorob (Válková et al., 2011). K faktorům ovlivňujícím úspěšnost léčby lze přiřadit také genotyp v oblasti lidského genu IL28B kódujícího interleukin 28B (interferon- λ 3), cytokin s imunomodulační aktivitou. Polymorfismy v blízkosti tohoto genu jsou asociovány jak se spontánní, tak léčbou indukovanou eliminací viru hepatitidy C z organismu (Galský et al., 2012).

2.6 Polymorfismus genu IL28B

Genetické polymorfismy (důsledky mutací v DNA zaznamenané u více než 1 % populace) jsou v posledních letech často předmětem výzkumných záměrů, protože genotyp samotného pacienta ovlivňuje průběh infekce i vnímavost k léčbě. Jednonukleotidový polymorfismus (SNP – z angl. Single Nukleotide Polymorphism) je jedním ze základních typů polymorfismů a jeho výskyt je možný v kódujících i v nekódujících oblastech DNA. Výskyt SNPs v kódující části DNA způsobuje strukturální a funkční změny proteinů, které mohou vést ke vzniku některých onemocnění nebo ke špatné léčebné odpovědi. Identifikování několika polymorfismů v blízkosti genu IL28B souvisejících s odpovědí na léčbu VHC se uskutečnilo v roce 2009. Nejčastěji bývá zkoumána asociace dosažení SVR s SNP označovaným jako rs12979860. Může se vyskytovat ve třech různých genotypech: CC, CT a TT. Ukazuje se, že pacienti s genotypem CC dosahují SVR signifikantně častěji než pacienti s genotypy CT a TT (Válková et al., 2011).

Vzhledem k tomu, že se při této diagnostice jedná o vyšetřování lidského genomu, je zapotřebí na toto vyšetření do laboratoře zaslat s materiálem též písemný souhlas pacienta s vyšetřením. Na našem pracovišti analýzu polymorfismu SNP rs12979860 genu IL28B provádíme od počátku roku 2012 metodou real-time PCR s analýzou křivky tání produktů navazující na amplifikaci DNA pacienta extrahované ze vzorku krve. Další možností je např. využití sekvenční analýzy DNA.

Lze předpokládat, že vyšetřování těchto polymorfizmů bude v budoucnosti důležitým prediktivním faktorem účinnosti léčby, který lze stanovit již před zahájením terapie, a bude jedním z parametrů v určování individuální terapie pro jednotlivé pacienty s chronickou hepatitidou C (Válková et al., 2011).

2.7 Specifická diagnostika virové hepatitidy C

Laboratorní diagnostika zacílená na určení či vyhledání patogena vyvolávajícího onemocnění v případě diagnostiky VHC kombinuje metodiky přímého a nepřímého průkazu (Krekulová a Řehák, 2002). Nepřímý průkaz zahrnuje vyšetření protilátek anti-HCV (protilátka proti viru hepatitidy C). Přímý laboratorní průkaz infekce představuje stanovení core antigenu a virové RNA. Testovaným materiálem je krev. Sérové protilátky bývají detekovatelné obvykle až za 6 – 8 týdnů od vstupu infekčního agens do organismu, mluvíme o tzv. diagnostickém oknu (Průša et al., 2009). V tomto období lze pro průkaz probíhající infekce využít stanovení HCV core antigenu nebo virové nukleové kyseliny (ABBOTT Diagnostics, 2009). V porovnání se stanovením anti-HCV má vyšetření kapsidového antigenu v séru význam ve zkrácení diagnostického okna přibližně o 3 týdny. HCV RNA metodou PCR nalézáme v krvi již ve 2. týdnu po naze, jedná se o nejčasnější detekci patogena po vstupu infekce do organismu (Průša et al., 2009).

V sérologické diagnostice nelze od sebe odlišit akutní a chronickou fázi infekce nebo rekonvalescenci. Nejčastější možnosti interpretace nálezů jsou uvedeny v tabulce 1 (Průša et al., 2009).

Tabulka 1 VHC – sérologické nálezy (Průša et al., 2009)

anti-HCV	HCV RNA	Interpretace nálezů (nejčastější možnosti)
pozitivní	negativní	stav po akutní hepatitidě C, která nepřešla do chronicity, nebo vyléčení z infekce
negativní	pozitivní	protilátky se ještě nestačily vytvořit nebo stav imunosuprese
pozitivní	pozitivní	akutní nebo (častěji) chronická hepatitida C

2.7.1 Detekce specifických protilátek proti viru hepatitidy C

Metody určené k detekci protilátek anti-HCV jsou zaměřené na přítomnost specifických protilátek třídy IgG. Tyto protilátky jsou v krvi pacienta detekovatelné pravděpodobně doživotně (Špičák, 2008), nejsou ale virus-neutralizační – nechrání proti reinfekci (Němeček, 2006).

Kvalitativní vyšetření anti-HCV v séru nebo plazmě se na našem pracovišti realizuje dvěma metodami firmy Abbott, a to ARCHITECT Anti-HCV a AxSYM HCV. Metody využívají k zachycení protilátek mikročástice potažené rekombinantními antigeny, kterými jsou protein HCV exprimovaný v *Escherichia coli* a protein exprimovaný v *Saccharomyces cereviae*.

Metoda ARCHITECT Anti-HCV je chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích. Množství protilátek přítomných ve vzorku je přímo úměrné chemiluminiscenčnímu signálu, který se měří v relativních světelných jednotkách RLU (Relative Light Units) detekovaných optickým systémem ARCHITECT v závěru analýzy (ABBOTT Diagnostics Division, 2009).

Metoda AxSYM HCV je enzymová imunoanalýza (EIA) sloužící ke kvalitativní detekci anti-HCV v lidském séru nebo plazmě. Určení přítomnosti protilátek se provádí porovnáním rychlosti tvorby fluorescenčního produktu s hodnotou cut-off, jež se předem získává vypočítáním z kalibrace metody AxSYM HCV (ABBOTT Diagnostics Division, 2008).

V metodách sloužících k vyhledání vzorků pozitivních na anti-HCV se až v 0,5 % případů vyskytují nespecifické falešně pozitivní výsledky, jež jsou způsobené sestavením těchto metod na bázi směsí rekombinantních nebo syntetických antigenů (přírodní antigeny nejsou k dispozici, virus se nedaří kultivovat). K eliminaci takovýchto výsledků slouží tzv. konfirmační testy, které jsou vhodné zejména u hraničních a slabě pozitivních záchytů anti-HCV. Předností těchto metod (např. Western blot) je možnost hodnocení protilátkové reakce proti jednotlivým antigenům (Němeček, 2006). Nevýhodou je vyšší cena a pracnost ve srovnání s vyhledávacími EIA metodami. Na našem pracovišti se jako konfirmační test používá LIA metoda (Line Immuno Assay) firmy Innogenetics. Metoda je založena na principu EIA probíhající na testovacím plastickém proužku s nylonovou membránou. Využívá HCV antigeny z core oblasti, povrchový glykoprotein E2, nestrukturální proteiny NS3, NS4, NS5 (INNOGENETICS, 2010).

2.7.2 Detekce core antigenu viru hepatitidy C

Detekce core antigenu je dlouhodobě dostupná samostatně nebo v kombinaci s detekcí anti-HCV protilátek, nejběžněji metodou ELISA.

V roce 2009 firma Abbott uvedla na náš trh chemiluminiscenční imunoanalýzu ARCHITECT HCV Ag, která umožňuje kvantitativní detekci core antigenu v séru nebo plazmě. Titr antigenu koreluje s množstvím HCV RNA (ABBOTT Diagnostics, 2009). Jedná se o alternativní metodu k testu HCV RNA, je cenově méně náročná a jednodušší co do provedení analýzy (Chevaliez et al., 2012).

Na našem pracovišti tuto diagnostiku nevyužíváme. Zatím ji plně nahrazuje (a v některých parametrech, jako je citlivost a dlouhodobá zkušenost s kvantifikací výsledku, dosud předčí) detekce virové nukleové kyseliny.

2.7.3 Detekce HCV-RNA

Průkaz nukleový kyselin (NK) je možný molekulárně biologickými metodami jako jsou PCR (polymerase chain reaction), TMA (transcription-mediated amplification), technikami hybrid-capture nebo branched DNA. V relativně nedávné době vyvinuté metody typu real-time PCR zdokonalily detekci a kvantifikaci virového genomu (Chevaliez et al., 2012).

Průkaz HCV RNA je využíván v případech podezření na akutní virovou hepatitidu C (protilátky se tvoří se zpožděním nebo – např. u výrazně imunosuprimovaných pacientů - vůbec), dále tato diagnostika slouží k získání informací podstatných před zahájením terapie (stanovení iničiálního množství viru v krvi, určení genotypu) i v průběhu léčby (monitorování virové nálože) (Průša et al., 2009).

Podrobněji je tato tematika rozvedena v kapitole 2.8.

2.8 Molekulárně biologické metody v diagnostice VHC

Molekulárně biologické metody jsou stále ve vývoji a nabízejí nové diagnostické možnosti. Přestože jsou pracovně, v nárocích na preciznost provedení a vybavení pracoviště i finančně náročné, mnoho lékařů a laboratoří se k nim přiklání pro jejich citlivost, specifčnost a výpovědní hodnotu jejich výsledku. (Krekulová a Řehák, 2002).

Do tohoto typu diagnostiky u onemocnění virovou hepatitidou C již začíná testováním tzv. polymorfizmu IL28B vstupovat též analýza lidského genomu

(viz. kapitola 2.6). V této kapitole se ale budeme dále zabývat specifickou molekulárně biologickou diagnostikou VHC, do které patří průkaz virové nukleové kyseliny, případně jeho další analýza.

2.8.1 Stanovení virémie HCV RNA

Od prosince 2006 se v naší laboratoři stanovuje virémie HCV RNA metodou COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test firmy Roche. Jedná se o amplifikační test pro kvantifikaci HCV RNA v lidské EDTA plazmě nebo séru. Stanovení HCV RNA touto metodou probíhá v přístroji COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan. Testování tímto automatem zahrnuje všechny postupné kroky od izolace až po amplifikaci a detekci HCV RNA v uzavřeném systému bez nutnosti přímého zásahu obsluhy, která pouze připravuje vzorek pro zpracování analyzátozem. Test je založen na reverzní transkripci cílové RNA, simultánní PCR amplifikaci cílové cDNA (komplementární DNA) a detekci rozštěpené, dvojitě značené oligonukleotidové sondy pro cílovou cDNA, jenž umožňuje nezávislou identifikaci amplikonu HCV a HCV QS (kvantifikační standarda). HCV QS je přidána ke každému vzorku. Srovnáním signálu HCV se signálem HCV QS analyzátozem vypočítá koncentraci HCV RNA v testovaném materiálu. Metoda dokáže detekovat a kvantifikovat HCV RNA všech genotypů (1 – 6), výsledky jsou vyjadřovány v počtu IU/ml (mezinárodních jednotek na mililitr). Od roku 2011 je na trhu další verze testu COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test, verze 2.0. Senzitivita metody byla stanovena na 15 IU/ml s lineárním rozsahem v rozmezí 15 IU/ml – 1,00E+08 IU/ml a specificita metody je 100 % (Roche Diagnostics, 2012), což splňuje nároky na molekulárně biologickou diagnostiku uvedené ve Standardním diagnostickém a terapeutickém postupu chronické infekce virem hepatitidy C (HCV), dokumentu vytvořeném členy pracovních skupin pro virové hepatitidy České hepatologické společnosti ČLS JEP a Společnosti infekčního lékařství ČLS JEP v lednu 2012.

2.8.2 Identifikace HCV genotypu

V případě zjištěné pozitivní virémie, lze ze vzorku provést stanovení HCV genotypu.

Určení genotypu se provádí podle sekvence nukleotidových bazí v NS5B nebo 5'UTR regionu virového genomu zjištěné sekvenční analýzou DNA nebo za využití technologie real-time PCR či metody reverzní hybridizace (Nakatani et al., 2011).

V další kapitole bude podrobněji probrána metoda určování HCV genotypů používaná na našem pracovišti.

3 PROBLEMATIKA URČENÍ GENOTYPU HCV

V této kapitole se budu zabývat metodou stanovení HCV genotypu používanou v naší laboratoři a jejími výsledky.

Pro určení HCV genotypu je potřeba dodržet všechny postupy spojené se zpracováním RNA molekulárně biologickými metodami, tzn. izolaci (extrakci) RNA z biologického materiálu, její reverzní transkripci na DNA, amplifikaci a detekci produktu.

Správnost výsledků testování byla každoročně ověřována tzv. externí kontrolou kvality pořádanou organizací QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics).

3.1 Izolace RNA

Příprava izolátu NK ze séra nebo plazmy pro určení HCV genotypu je prováděna manuálně nebo za pomoci automatu. Při ručním způsobu extrakce RNA se pracuje s reagensii soupravy AMPLICOR[®] HCV Specimen Preparation Kit (Roche). Izolace RNA za pomoci automatu probíhá při použití setu High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche), určeného pro analyzátor MagNA Pure Compact.

Nejprve se uskuteční lýza virových částic pomocí tzv. chaotropního činidla, následuje srážení RNA alkoholem. Uvolněná HCV RNA je resuspendována ve vhodném ředidle.

Pro kontrolu správného průběhu extrakce, amplifikace a detekce se ke vzorku na počátku zpracování současně s lyzačním činidlem přidává tzv. interní kontrola. HCV interní kontrola je RNA transkript, který se skládá z oblastí vazby primeru, jež jsou shodné s oblastmi v cílové (target) sekvenci HCV. Od terčového ampliconu se liší v oblasti vazby sondy, což umožňuje při detekci odlišit amplicony cílové RNA od ampliconů interní kontroly. Při vyhodnocení detekce zjištěná současná negativita interní kontroly i cílové NK ve zpracovávaném vzorku signalizuje chybu v jednom z kroků zpracování a proces je nutno opakovat. Na izolaci HCV RNA navazuje reverzní transkripce a amplifikace (RT-PCR) (Roche Diagnostics, 2009), poté následuje hybridizace získaných produktů.

3.2 Reverzní transkripce a amplifikace

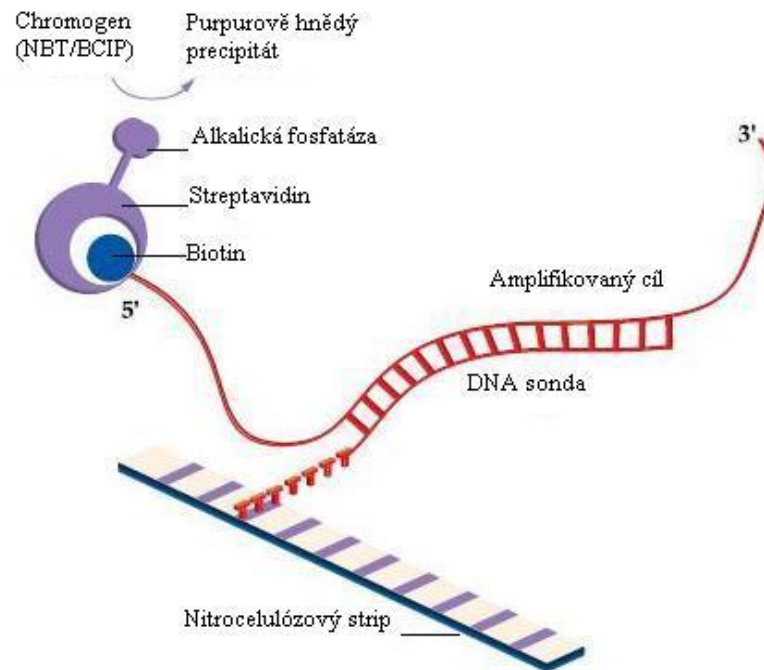
Reverzní transkripce, amplifikace i detekce probíhají automaticky v analyzátoru COBAS AMPLICOR v rámci metody COBAS AMPLICOR Hepatitis C Virus Test (Roche). RT-PCR se uskutečňuje v přítomnosti tepelně stálého enzymu DNA polymerázy. Tento enzym má v přítomnosti Mn^{2+} aktivitu reverzní transkriptázy i DNA polymerázy, proto mohou reakce probíhat v jedné reakční směsi. Amplifikační směs je tvořena dvěma primery, ionty Mn^{2+} , deoxynukleosid-trifosfáty (dNTPs) a enzymem DNA polymerázou. Tato směs se přidává k izolované HCV RNA. Jeden z primerů má na 5' konci navázán biotin (který je důležitý pro detekci produktu). Po zahřátí reakční směsi se biotinylovaný primer specificky váže na target HCV RNA (zvolena z 5' UTR oblasti genomu) a HCV interní kontrolu. Enzym vytváří cDNA k cílové RNA prodloužením primeru pomocí Mn^{2+} a nadbytku dNTPs. Druhý primer se při ochlazení reakční směsi specificky váže k cDNA, dochází k opětovnému prodloužení cDNA. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HCV mezi dvěma primery.

Po PCR amplifikaci dochází k denuraci HCV amplikonu a tím k vytvoření jednovláknové DNA, která je použitelná pro hybridizační reakci (Roche Diagnostics, 2009).

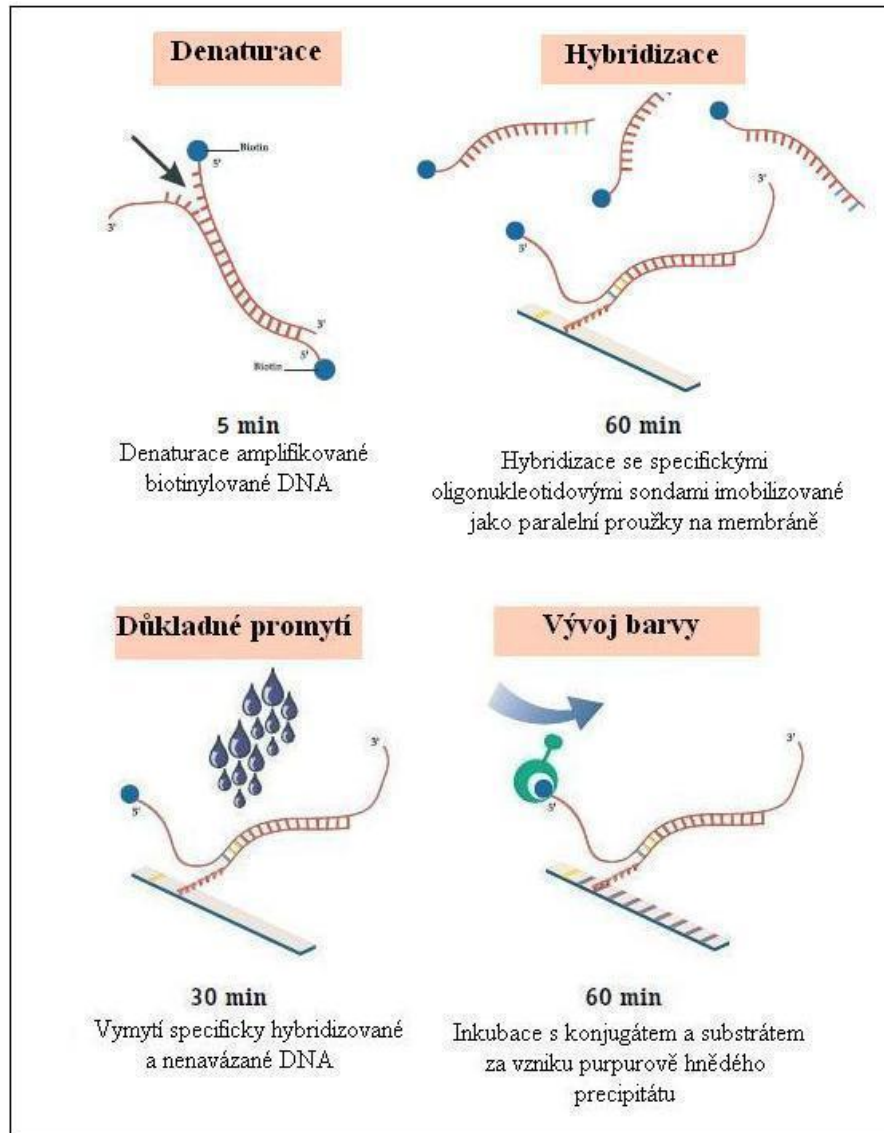
3.3 Detekce produktu

Detekce produktu se uskutečňuje pomocí metody Versant HCV Genotype Assay LiPA (v minulosti produkt firmy Bayer, nyní Siemens), založené na principu reverzní hybridizace. Amplifikovaná biotinylovaná DNA je chemicky denaturovaná, jednotlivé řetězce poté hybridizují se specifickými oligonukleotidovými sondami, paralelně imobilizovanými na membráně pokrývající testovací proužek (strip). Důkladným promytím dojde k odstranění nenahybridizovaného amplifikovaného materiálu. Poté se přidá streptavidin konjugovaný s alkalickou fosfatázou napojí na biotinylovanou DNA navázanou na sondě. Následnou inkubací se substrátem obsahujícím chromogen se vytváří purpurově hnědý precipitát. Po zastavení reakce se získá vzor reaktivních sond vhodný k vyhodnocení pomocí interpretační tabulky, která je součástí soupravy a obsahuje vzorce pro odečet všech hlavních genotypů a významných subtypů HCV (Siemens, 2008).

Princip metody je schématicky znázorněn na obrázku 2 a základní kroky hybridizace metody pak na obrázku 3.



Obrázek 2 LiPA technologie – princip reverzní hybridizace (upraveno podle http://www.innogenetics.com/fotos/INNO-LiPA_HBV_Technician.pdf)



Obrázek 3 LiPA technologie – schéma provedení metody (upraveno podle http://www.innogenetics.com/fotos/INNO-LiPA_HBV_Technician.pdf)

3.4 Statistické zpracování dat

Metoda určení genotypu HCV se na našem pracovišti provádí od 1.6.2005. Výsledky byly průběžně zaznamenávány do laboratorního informačního systému (LIS) firmy Stapro. Pro statistické vyhodnocování byla použita data stažená z LIS za období od 1.7.2005 do 30.6.2012. Pro jejich další zpracování byl použit program Microsoft Office Excel 2007. Výsledky jsem vyhodnotila na základě absolutní a relativní četnosti. Ve své práci jsem je prezentovala formou tabulek a grafů.

Při posuzování parametrů v jednotlivých letech sledovaného období byly do zpracování zahrnuty i roky 2005 a 2012, ačkoli se fakticky jedná pouze o jejich

pololetí. Absolutní počty stanovení genotypu VHC jsou uvedeny v tabulce 2. Je zřejmé, že velikost souboru za II. pololetí roku 2005 je ve srovnání s ostatními obdobími menší, ale pro zpracování formou relativní četnosti dostatečná. Za I. pololetí roku 2012 je velikost souboru jednoznačně srovnatelná se soubory z předchozích let.

Tabulka 2 Počty stanovení HCV genotypů ve sledovaném období v jednotlivých letech – absolutní počty

Období	2005 II.pololetí	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012 I.pololetí
Počet stanovení HCV genotypů	177	322	267	319	303	331	228	238

Při definování cíle statistického zpracování dat jsem se inspirovala údaji publikovanými v časopise *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* ročník 58, číslo 2. Do studie „Situace s trendy v zastoupení genotypů viru hepatitidy C v populaci injekčních uživatelů drog“ (Krekulová et al., 2009) bylo vybráno 222 pacientů nově registrovaných v letech 2005 – 2007 ve specializovaném pražském ambulancním zařízení. Z celkového počtu probandů studie 69 % (154) tvořili muži a 31 % (68) ženy. Věk osob zařazených do studie byl v rozmezí 17 – 46 let, průměrný věk u mužů byl 27,8 let a u žen 25,4 let (Krekulová et al., 2009).

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky zastoupení jednotlivých genotypů a subtypů HCV v letech 2005 – 2007 u injekčních uživatelů drog. Jediný statisticky významný meziroční rozdíl v zastoupení genotypů byl 2006 – 2007 u HCV genotypu 3a (nárůst o 18 %). Autoři této studie své výsledky srovnávali s historickou kontrolou z let 1998 – 2000 (tabulka 4). V období 2005 – 2007 byl zaznamenán významný nárůst subtypu 1a o 13,5 %, subtypu 3a o 23,5 % a pokles subtypu 1b o 30 % (Krekulová et al., 2009).

Tabulka 3 Přehled zastoupení jednotlivých genotypů a subtypů HCV (Krekulová et al., 2009)

Genotyp	Rok 2005	Rok 2006	Rok 2007	Celkem
1a	20 (39,0 %)	44 (44,5 %)	26 (36,0 %)	90 (40,5 %)
1b	20 (39,0 %)	37 (37,5 %)	21 (29,0 %)	78 (35,0 %)
2a	1 (2,0 %)	0	0	1 (0,5 %)
2b	0	1 (1,0 %)	0	1 (0,5 %)
3a	10 (17,0 %)	17 (17,0 %)	25 (35,0 %)	52 (23,5 %)

Tabulka 4 Srovnání genotypového zastoupení HCV s historickou kontrolou (Krekulová et al., 2009)

Genotypy	1998 – 2000	2005 – 2007	Poznámka
1a	14 (27,0 %)	90 (40,5 %)	nárůst subtypu 1a
1b	34 (65,0 %)	78 (35,0 %)	pokles subtypu 1b
2	1 (2,0 %)	0	
2a	0	1 (0,5 %)	
2b	0	1 (0,5 %)	
3	3 (6,0 %)	0	
3a	0	52 (23,5 %)	zásadní změna – nárůst genotypu 3a
Celkem	52 (100 %)	222 (100 %)	

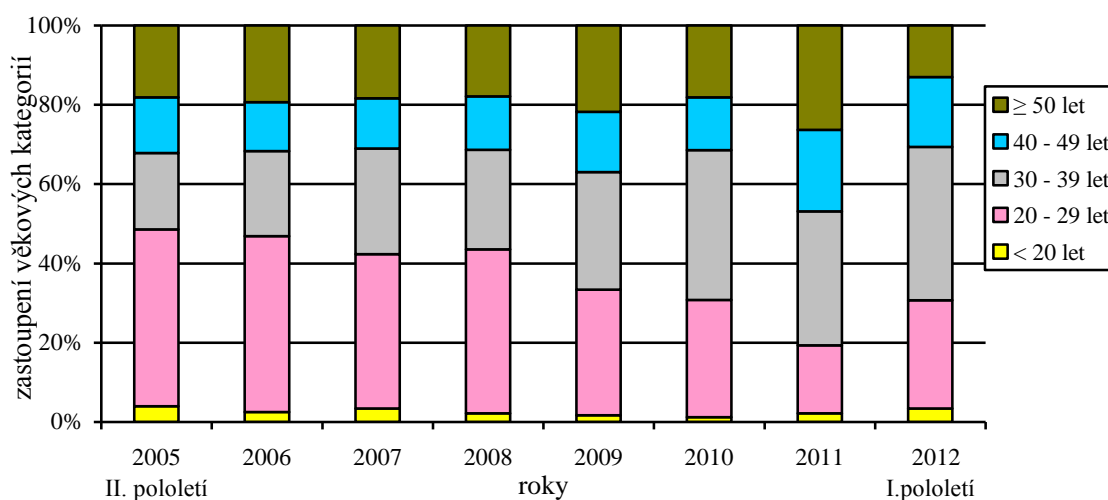
V rámci druhé studie „Genotypová heterogenita viru hepatitidy C (HCV) u dárců krve v ČR“ (Němeček a Strunecký, 2009) byly testovány izoláty HCV zachycené při screeningu dárců v letech 1999 – 2007. Genotypová analýza byla uskutečněna u 188 dárců krve, z toho bylo 125 mužů (66,5 %) a 63 žen (33,5 %). Průměrný věk dárců zavzatých do studie byl u mužů 29,2 let a u žen u 40,1 let. Tato studie prokázala, že nejpočetněji je zastoupen genotyp 1b (66,0 %), genotyp 3a se objevuje v 19,7 % a genotyp 1a ve 13,3 %. Genotypy 2a a 2b byly ze studie vyřazeny pro jejich nižší výskyt (každý v 0,5 %). Regresní analýza ukázala, že výskyt genotypů je závislý na věku, tj. výskyt genotypu 1a a 3a s narůstajícím věkem klesá a výskyt genotypu 1b vzrůstá (Němeček, Strunecký, 2009).

Informace získané zpracováním dat z našeho pracoviště budu v diskuzi porovnávat s výsledky studií uvedených v těchto člancích.

Cílem mého statistického zpracování bylo především tedy určit zastoupení jednotlivých HCV genotypů zjištěných v naší laboratoři, poměr jejich četností v jednotlivých letech sledovaného období a jejich vztah k pohlaví a věku pacientů. Zaměření dalších analýz souviselo se snahou zjistit některé údaje o klientele našeho pracoviště.

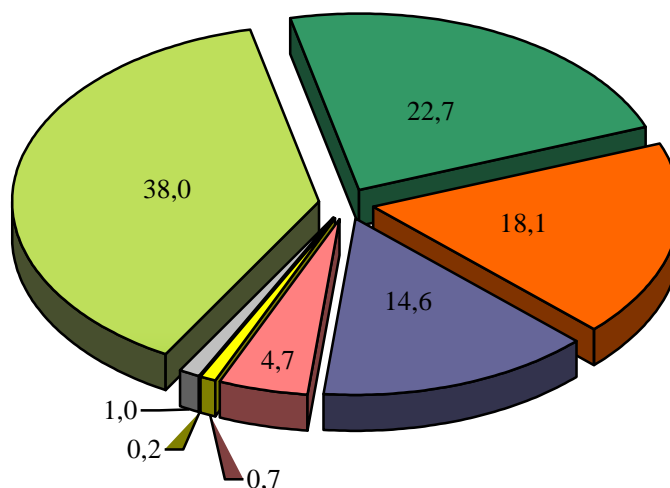
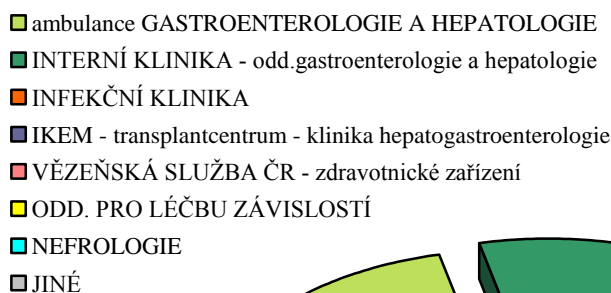
4 VÝSLEDKY

V období od 1.7.2005 do 30.6.2012 bylo v naší laboratoři na HCV genotyp vyšetřeno 2 185 vzorků. Soubor obsahoval vzorky od 1 372 (62,8 %) mužů a 813 (37,2 %) žen. Nejmladší pacient byl dvouletý, nejstaršímu bylo 87 let. Průměrný věk v celém souboru byl 36,7 let, u mužů 36,2 let a u žen 37,6 let. V posledních třech letech sledovaného období převládá v počtu vyšetřených věková kategorie 30 – 39 let, v prvenství nahradila kategorii 20 – 29 let. Podrobnější analýza věkových kategorií vyšetřených pacientů je zpracovaná v grafu 3.



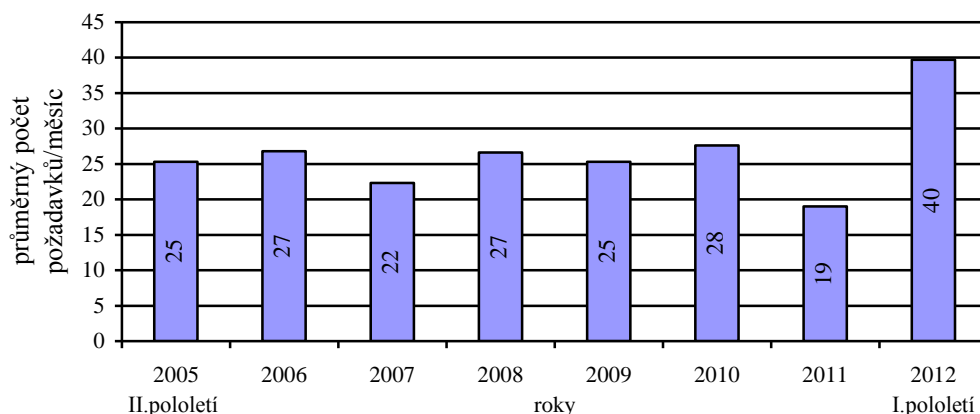
Graf 3 Zastoupení věkových kategorií testovaných pacientů na sledovaný parametr ve sledovaném období – relativní četnost

Většinu požadavků na vyšetření HCV genotypů na naše oddělení poslali specialisté z Prahy (1988 požadavků, tj. 91 %), ale též mimopražští (197 požadavků, tj. 9 %), např. ze zdravotnických zařízení v Kolíně, Jindřichově Hradci, Mladé Boleslavi, České Lípě. V grafu 4 je znázorněno poměrné zastoupení typů pracovišť posílajících vzorky na vyšetření HCV genotypů. Nejhojněji jsou zastoupena specializovaná ambulantní pracoviště gastroenterologie a hepatologie (38,0 %), následují interní kliniky (22,7 %), infekční oddělení (18,1 %) a největší transplantační středisko v ČR IKEM (14,6 %).



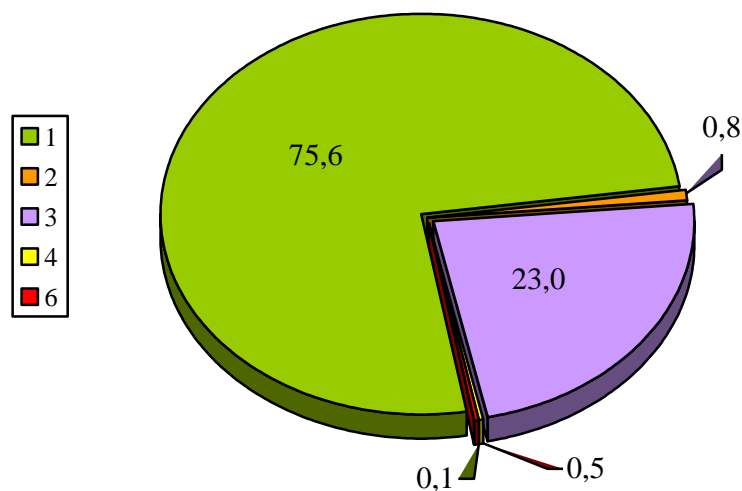
Graf 4 Zastoupení pracovišť posílajících požadavky na vyšetření HCV genotypu ve sledovaném období – relativní četnost

Průměrný měsíční počet požadavků na vyšetření HCV genotypů ve sledovaném období znázorňuje graf 5. V letech 2005 – 2010 se poptávka pohybovala na přibližně na stejné úrovni, v roce 2011 jsme zaznamenali pokles zájmu o toto vyšetření, ale v letošním roce již máme viditelný nárůst počtu vyšetření oproti předchozímu období.



Graf 5 Průměrný počet požadavků za měsíc na vyšetření HCV genotypů ve sledovaném období

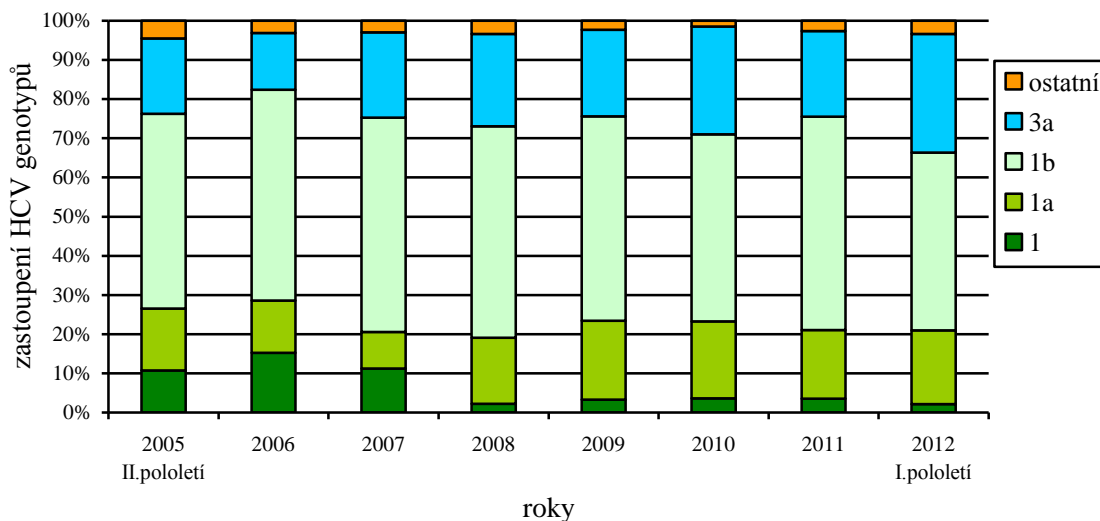
Graf 6 znázorňuje zastoupení hlavních HCV genotypů detekovaných v celém sledovaném období. Je zřejmé, že nejvíce je zastoupen HCV genotyp 1 (75,6 %) a po něm následuje genotyp 3 (23,0 %).



Graf 6 Zastoupení hlavních HCV genotypů ve sledovaném období – relativní četnost

Genotypovou analýzou jsme určili tyto genotypy: 1, 1a, 1b, 1a nebo 1b, 2, 3, 3a, 4, 6, 1a/3a, 1b/3a, 1/2. Málo četné genotypy jsou v dalším statistickém rozboru označeny jako ostatní (tj. genotypy 1a nebo 1b, 2, 3, 4, 6, 1a/3a, 1b/3a, 1/2).

Pro orientační představu zastoupení určených HCV genotypů v jednotlivých letech ve sledovaném období jsem vytvořila graf 7. Podrobněji je toto zpracováno v tabulce 5, ve které jsou zahrnuty absolutní i relativní počty. Je patrné, že genotyp 1b si drží první místo v zastoupení mezi jednotlivými genotypy. U genotypu 3a je znatelný postupný nárůst jeho četnosti (v I. pololetí 2012 jsme zaznamenaly vzestup o 7,4 % oproti roku 2011).

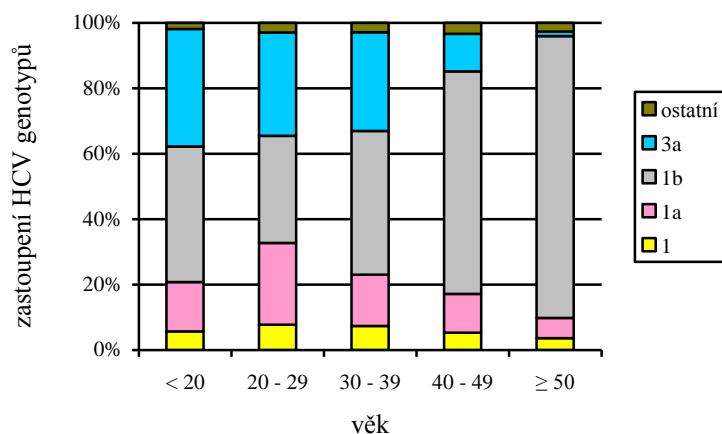


Graf 7 Zastoupení určených HCV genotypů ve sledovaném období – relativní četnost

Tabulka 5 Zastoupení jednotlivých HCV genotypů – absolutní i relativní četnost

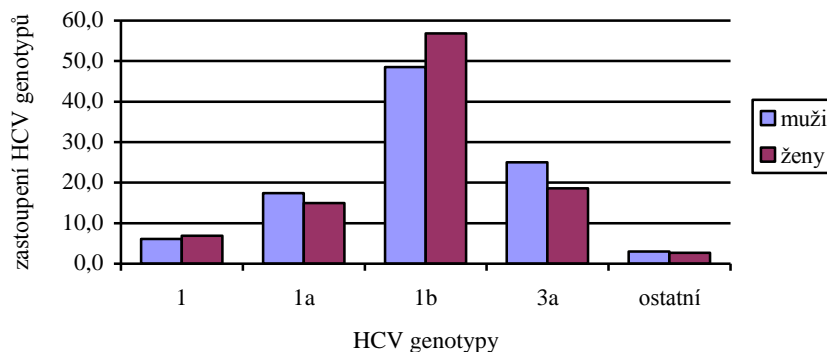
Genotyp	2005 II.pololetí	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012 I.pololetí
1	19 (10,7 %)	49 (15,3 %)	30 (11,3 %)	7 (2,2 %)	10 (3,3 %)	12 (3,6 %)	8 (3,5 %)	5 (2,1 %)
1a	28 (15,8 %)	43 (13,4 %)	25 (9,4 %)	54 (17,0 %)	61 (20,2 %)	65 (19,6 %)	40 (17,6 %)	45 (18,9 %)
1b	88 (49,7 %)	173 (53,9 %)	146 (55,1 %)	172 (54,3 %)	158 (52,3 %)	158 (47,7 %)	124 (54,6 %)	108 (45,4 %)
3a	34 (19,2 %)	47 (14,6 %)	58 (21,9 %)	75 (23,7 %)	67 (22,2 %)	91 (27,5 %)	50 (22,0 %)	72 (30,3 %)
Ostatní	8 (4,5 %)	10 (3,1 %)	8 (3,0 %)	11 (3,4 %)	7 (2,3 %)	5 (1,5 %)	6 (2,6 %)	8 (3,4 %)

Poměrné zastoupení HCV genotypů ve sledovaném období ve věkových kategoriích je znázorněno grafem 8. Je patrné, že ve věku < 20 let je nejvíce zastoupen HCV genotyp 1b (41,5 %) a 3a (35,8 %). Pacienti ve věku 20 – 29 let jsou infikováni nejvíce HCV genotypy 1b (32,8 %) a 3a (31,6 %). Ve věku 30 – 39 let se nejvíce vyskytují genotypy 1b (43,9 %) a 3a (30,3 %). U nemocných ve věku 40 – 49 let se v 67,9 % vyskytuje genotyp 1b, který je dominantní také u osob nad 50 let (v 86,1 %).



Graf 8 Poměrné zastoupení u nás nejběžnějších HCV genotypů ve sledovaném období ve věkových kategoriích

Poměrné zastoupení u nás nejběžnějších HCV genotypů v závislosti na pohlaví ve sledovaném období znázorňuje graf 9. V našem souboru u žen i mužů převažuje genotyp 1b (muži 48,5 %, ženy 56,8 %).



Graf 9 Poměrné zastoupení u nás nejběžnějších HCV genotypů v závislosti na pohlaví ve sledovaném období

5 DISKUZE

Vyšetření HCV genotypu na našem pracovišti provádíme při požadavku z klinického pracoviště u HCV RNA pozitivních vzorků.

V období od 1.7.2005 do 30.6.2012 byla tato analýza provedena u 2 185 vzorků. Z toho 62,8 % vyšetřených materiálů bylo od mužů a 37,2 % od žen, což je poměr zastoupení pohlaví podobný jako ve studiích Krekulové et al. (69 % mužů a 31 % žen) (Krekulová et al., 2009) a Němečka et al. (66,5 % mužů a 33,5 % žen) (Němeček a Strunecký, 2009).

Průměrný věk pacientů v době testování jejich materiálů byl 36,7 let a téměř se u obou pohlaví nelišil (průměrný věk mužů 36,2 let, žen 37,6 let). Průměrný věk pacientů ve studiích Krekulové et al. a Němečka et al. se od tohoto údaje liší a je to pravděpodobně dáno rozdílnými typy zařízení, která data vyhodnocovala a jinými charakteristikami souborů vyšetřovaných pacientů. U Krekulové et al. se jednalo o populaci injekčních uživatelů drog (průměrný věk u mužů 27,8 let a u žen 25,4 let) (Krekulová et al., 2009), u Němečka et al. o dárce krve (průměrný věk u mužů 29,2 let a u žen 40,1 let) (Němeček a Strunecký, 2009). Naše pracoviště zpracovává materiály ze specializovaných pracovišť řešících problematiku VHC až k event. transplantaci jater.

Zastoupení genotypů ve studovaném souboru za celé období popisuje graf 7 a tabulka 5. Statistická analýza prokázala výskyt genotypu 1 bez určení subtypu v 6,4 %, genotypu 1a v 16,5 %, 1b v 51,6 %, 3a ve 22,6 %. Nejhojněji je tedy zastoupen genotyp 1 (s převahou 1b) následovaný genotypem 3a, což je ve shodě se studií Esteban et al. (2008). Ve vztahu k úspěšnosti terapie je to nevýhodný poměr (genotyp 1 je hůře ovlivnitelný léčbou než genotyp 3) (Galský et al., 2012). Podobně také Němeček et al. ve své genotypové analýze dárců krve v období let 1999 – 2000 v ČR prokázal zastoupení genotypu 1a v 12,3 %, genotypu 1b v 66 %, genotypu 3a v 19,7 % (Němeček a Strunecký, 2009). Oproti tomu Krekulová et al. ve své studii v období 2005 – 2007 určila zastoupení genotypu 1a v 40,5 %, genotyp 1b v 35,0 % a genotyp 3a ve 23,5 % (Krekulová et al., 2009), což u genotypu 1a a 1b neodpovídá námi získaným četnostem.

Graf 8 potvrzuje i z výsledků našeho souboru hypotézu ze studie Němečka et al. týkající se zastoupení genotypů ve vztahu k věku pacientů. S narůstajícím věkem

pacientů výskyt HCV genotypů 1a a 3a klesá, zatímco četnost genotypu 1b stoupá. Toto je v korelaci se skutečností, že distribuce genotypů souvisí se způsobem přenosu infekce HCV: genotypy 1a, 3a jsou asociovány s přenosem v rámci injekčního užívání drog, genotyp 1b s iatrogenním přenosem (transfúze, transplantace) (Esteban et al., 2008) a také s tím, že v současné době i u nás je přenos VHC uskutečňován především v populaci IUD (injekčních uživatelů drog) (Urbánek, 2005) a podíl iatrogenních infekcí klesá (Němeček a Strunecký, 2009).

6 ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem shrnula důležité poznatky z oblasti problematiky virové hepatitidy C a vlastní zkušenosti s laboratorní diagnostikou této infekce získané na akreditovaném pracovišti (podle ČSN EN ISO 15189:2007), které se této problematice věnuje dlouhodobě a na vysoké úrovni.

Jsem ráda, že údaje získané statistickým zpracováním výsledků HCV genotypů na našem pracovišti jsou v souladu s výsledky studií Krekulové et al. (2009) a Němečka et al. (2009) a zjištěné zastoupení HCV genotypů v našich vzorcích odpovídá epidemiologickým datům v práci zahraničních autorů Esteban et al.(2008).

Do budoucna bude zajímavé, nakolik uvedení nové kategorie léků do léčby chronické VHC ovlivní další trend v požadavcích na laboratorní diagnostiku. V současné době již zaznamenáváme ze strany specializovaných klinických pracovišť zájem o testování lékové rezistence na nově užívané antivirové přípravky. Genotypizace nadále zůstane důležitou součástí diagnostiky, protože u nových virostatik byla zjištěna jejich rozdílná aktivita vůči různým genotypům HCV. (Galský et al., 2012).

7 SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

Obrázek 1	Virus hepatitidy C (HCV): model struktury a organizace genomu.....	12
Obrázek 2	LiPA technologie – princip reverzní hybridizace	23
Obrázek 3	LiPA technologie – schéma provedení metody	24
Graf 1	Hlášené případy VHC (akutní i chronické) v České republice v letech 2002 – 2011 – absolutně (Epidata SZÚ, cit. 2012-04-02)	11
Graf 2	Hlášené případy VHC (akutní i chronické) v České republice v letech 2002 – 2011, na 100 000 obyvatel – relativně (Epidata SZÚ, cit. 2012-07-18).....	11
Graf 3	Zastoupení věkových kategorií testovaných pacientů na sledovaný parametr ve sledovaném období – relativní četnost.....	27
Graf 4	Zastoupení pracovišť posílajících požadavky na vyšetření HCV genotypu ve sledovaném období – relativní četnost	28
Graf 5	Průměrný počet požadavků za měsíc na vyšetření HCV genotypů ve sledovaném období.....	28
Graf 6	Zastoupení hlavních HCV genotypů ve sledovaném období – relativní četnost	29
Graf 7	Zastoupení určených HCV genotypů ve sledovaném období – relativní četnost ..	30
Graf 8	Poměrné zastoupení u nás nejběžnějších HCV genotypů ve sledovaném období ve věkových kategoriích	31
Graf 9	Poměrné zastoupení u nás nejběžnějších HCV genotypů v závislosti na pohlaví ve sledovaném období.....	31

Tabulka 1	VHC – sérologické nálezy (Průša et al., 2009).....	16
Tabulka 2	Počty stanovení HCV genotypů ve sledovaném období v jednotlivých letech – absolutní počty	25
Tabulka 3	Přehled zastoupení jednotlivých genotypů a subtypů HCV (Krekulová et al., 2009)	25
Tabulka 4	Srovnání genotypového zastoupení HCV s historickou kontrolou (Krekulová et al., 2009)	26
Tabulka 5	Zastoupení jednotlivých HCV genotypů – absolutní i relativní četnost.....	30

8 POUŽITÁ LITERATURA A PRAMENY

ABBOTT Diagnostics Division: Příbalový leták *ARCHITECT Anti-HCV*, říjen 2009, 48-8643/R6 B6C377.

ABBOTT Diagnostics Division: Příbalový leták *AxSYM HCV*, září 2008, B3B447 48-0718/R10.

ABBOTT Diagnostics: Informace o nových produktech: *ARCHITECT HCV Ag*. 27. 5. 2009. [online]. [cit. 2012-06-08]. Dostupné z: <http://www.abbottdiagnostics.cz/nove-produkty/rok-2009/imunoanaliza/architect-hcv-ag.html>

ANZOLA, M., BURGOS, J., J.: *Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003, roč. 5, č. 28, s. 4. ISSN 1462-3994.

ASHFAQ, UA., JAVED, T., REHMAN, S., NAWAZ, Z., RIAZUDDIN, S.: *An overview of HCV molecular biology, replication and imine responses*. Virology Journal, 2011, roč. 8, č. 161, s. 1 – 10. ISSN 1743-422X

BENEŠ, J.: *Infekční lékařství*. 1. vydání. Praha: Galén, s.r.o., 2009. s. 140 - 163 . ISBN 978-80-7262-644-1.

ESTEBAN, JI., SAULEDA, S., QUER, J.: *The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe*. Journal of Hepatology, 2008, roč. 48, č. 1, s. 148 – 162. ISSN 0168-8278. [online]. [cit. 2012-07-2]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827807005739>

GALSKÝ, J., HUSA, P., HEJDA, V., KÜMPEL, P., NĚMEČEK, V., PLÍŠEK, S., ŠPERL, J., URBÁNEK, P., VOLFOVÁ, M.: *Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV)*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2012, roč. 18, č. 3, s. 75 – 89. ISSN 1211-264X.

HUSA, P.: *Virové hepatitidy*. 1. vydání. Praha: Galén, s.r.o., 2005. 247 s. ISBN 80-7262-304-4.

CHEVALIEZ, S., RODRIGUEZ, CH., PAWLITSKY, JM.: *New Virologic Tools for Management of Chronic Hepatitis B and C*. *Gastroenterology*, 2012, roč. 142, č. 6, s. 1303 – 1313. ISSN 00165085. [online]. [cit. 2012-07-26]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508512002405>

INNOGENETICS: *INNO-LiPA HBV Technical*. 2006. [online]. [cit. 2012-07-23]. Dostupné z: http://www.innogenetics.com/fotos/INNO-LiPA_HBV_Technician.pdf

INNOGENETICS: Příbalový leták *INNO-LIA™ HCV Score*, 16. 12. 2010, 25428 v13.

KREKULOVÁ, L., ŘEHÁK, V., STRUNECKÝ, O., NĚMEČEK, V.: *Situace a trendy v zastoupení genotypů viru hepatitidy C v populaci injekčních uživatelů drog*. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Časopis společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti J. E. Purkyně, 2009, roč. 58, č. 2, s. 64. ISSN 1210-7913. [online]. [cit. 2012-07-22]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/epidemiologie-archiv-cisel?id=445>

KREKULOVÁ, L., ŘEHÁK, V.: *Virové hepatitidy: Prevence, diagnostika a léčba*. 2. vydání. Praha: Triton, 2002, 167 s. ISBN 80-7254-218-4.

MOGHADDAM, A., MELUM, E., REINTON, N., RING-LARSEN, H., VERBAAN, H., BJØRO, K., DALGARD, O.: *IL28B Genetic Variation and Treatment Response in Patients with Hepatitis C Virus Genotype 3 Infection*. *Hepatology*, 2011, roč. 53, č. 3, s. 746 – 754. ISSN 0270-9139.

MRAVČÍK, V., PETROŠOVÁ, B., ZÁBRANSKÝ, T., ŘEHÁK, V., COUFALOVÁ, M.: *Výskyt VHC u injekčních uživatelů drog. Výsledky studie prováděné mezi klienty nízkoprahových zařízení v letech 2002 – 2005*. 1. vydání. Úřad vlády České republiky, 2009. s. 11. ISBN 978-80-7440-003-2. [online]. [cit. 2012-06-22]. Dostupné z: http://www.drogy-info.cz/index.php/publikace/e_publikace/vyskyt_vhc_u_injekcnich_uzivatelu_drog

MRAVČÍK, V.: *Léčba VHC u injekčních uživatelů drog v ČR – průzkum mezi centry pro léčbu virových hepatitid*. Adiktologie, 2012, roč. 12, č. 1, s. 12. ISSN 1213-3841.

NAKATANI, SM., SANTOS, CA., RIEDIGER, IN., KRIEGER, MA., DUARTE, CAB., DEBUR, MD., CARRILHO, FJ., ONO, SK.: *Comparative performance evaluation of hepatitis C virus genotyping based on the 5' untranslated region versus partial sequencing of the NS5B region of brazilian patients with chronic hepatitis C*. Virology Journal, 2011, roč. 8, č. 459, s. 2 – 5. ISSN 1743-422X. [online]. [cit. 2012-07-25]. Dostupné z: <http://www.virologyj.com/content/8/1/459>

NĚMEČEK, V., STRUNECKÝ, O.: *Genotypová heterogenita viru hepatitidy C (HCV) u dárců krve v ČR*. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie. Časopis společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti J. E. Purkyně, 2009, roč. 58, č. 2, s. 64. ISSN 1210-7913. [online]. [cit. 2012-06-30]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/epidemiologie-archiv-cisel?id=445>

NĚMEČEK, V.: *Virové hepatitidy: laboratorní diagnostika a interpretace nálezů*. Vox paediatricae, 2006, roč. 6, č. 7, s. 25 – 26. ISSN 1213-2241. [online]. [cit. 2012-07-25]. Dostupné z: http://www.detskylekar.cz/cps/rde/xbcr/dlekar/vox_zari_2006_final.pdf

PROČKE, M.: *Novinky v léčbě virové hepatitidy C*. Tempus Medicorum, 2011, roč. 20, s. 21 – 22. ISSN 1214-7524. [online]. [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: <http://content.yudu.com/Library/A1uerh/TempusMedicorum10201/resources/index.htm?referrerUrl=http%3A%2F%2Ffree.yudu.com%2Fitem%2Fdetails%2F425111%2FTempus-Medicorum-10-2011%3Frefid%3D23303>

PRŮŠA, R. a kol: *Průvodce laboratorními nálezy: Sexuálně přenosná onemocnění (STD/STI)*. Praha: Dr. Josef Raabe, s.r.o., 2009, s. C 1.7/26 – C 1.7/28. ISSN 1803-5728.

Roche Diagnostics: Příbalový leták *COBAS® AMPLICOR™ Hepatitis C Virus Test, version 2.0*. 2009, 00058003595-07ENGL.

Roche Diagnostics: Příbalový leták *COBAS® AmpliPrep/COBAS TaqMan® HCV Test, version 2.0*. 2012, 05902754001-01 EN.

ROŽNOVSKÝ, L.: *Virové hepatitidy u dětí a mladistvých a jejich prevence vakcinací*. *Pediatric pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 4, s. 228 – 230. ISSN 1213-0494. [online]. [cit. 2012-06-30]. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-200704-0008.php>

SIEMENS: Příbalový leták: *Versant HCV – Genotype Assay (LiPA)*, červen 2008, 26017 Rev. 3.

STRÁNSKÝ, J.: *Virová hepatitida C*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1999. 196 s. ISBN 80-7169-818-0.

SZÚ. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2002 – 2011 – absolutně: Hlášený výskyt infekčních nemocí v České republice v Epidatu v letech 2002 – 2011 – absolutně – předběžná data* [online]. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolutne>.

SZÚ. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2002 – 2011 – relativně: Hlášený výskyt infekčních nemocí v České republice v Epidatu v letech 2002 – 2011, na 100 000 obyvatel*. [online]. [cit. 2012-07-18]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-relativne>

ŠPIČÁK, J. a kol.: *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2008, s. 295 – 324. ISBN 978-80-247-1783-8.

TRUNEČKA, P.: *Indikace k transplantaci jater: Doporučený postup*. *Klinika hepatogastroenterologie IKEM*. Transplantcentrum IKEM, 2000, s. 16. [online]. [cit. 2012-07-07]. Dostupné z: <http://www.ces-hep.cz/doporučený-postup-chs-pro-indikaci-k-transplantaci-jater>

URBÁNEK, P.: *Infekce virem hepatitidy C*. Remedia, 2005, roč. 15, č. 1, s. 75.
ISSN 0862-8947. [online]. [cit. 2012-06-30]. Dostupné z:
<http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2005/1-2005/Infekce-virem-hepatitidy-C/e-9n-9J-ao.magarticle.aspx>

VÁLKOVÁ, I., KRISTIAN, P., SCHRÉTER, V., HABALOVÁ, V.: *Genetické polymorfizmy ako nové prediktívne faktory úspešnosti liečby chronickej hepatitidy C*.
Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2011, roč. 17, č. 6, s. 190 – 193.
ISSN 1211-264X.